

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

ANALÝZA PROTEOMU PIVA POMOCÍ HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. LUKÁŠ MÜLLER

BRNO 2009



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ
FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

ANALÝZA PROTEOMU PIVA POMOCÍ HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

BEER PROTEOME ANALYSIS BY MASS SPECTROMETRY

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

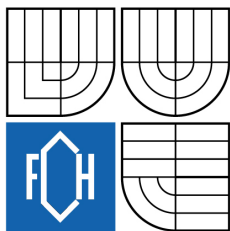
AUTOR PRÁCE
AUTHOR

Bc. LUKÁŠ MÜLLER

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

RNDr. ZBYNĚK ZDRÁHAL, CSc.

BRNO 2009



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0242/2008	Akademický rok: 2008/2009
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Bc. Lukáš Müller	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (N2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)	
Vedoucí diplomové práce:	RNDr. Zbyněk Zdráhal, CSc.	
Konzultanti diplomové práce:	doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.	

Název diplomové práce:

Analýza proteomu piva pomocí hmotnostní spektrometrie

Zadání diplomové práce:

- 1) Literární rešerše zaměřená na moderní instrumentální metody analýzy proteinů
- 2) Současný stav analýzy proteomu piva
- 3) Příprava vzorků piv pro MS analýzu
- 4) Analýza vybraných proteinů a jejich identifikace pomocí LC-MS/MS.
- 5) Vyhodnocení a diskuse výsledků.

Termín odevzdání diplomové práce: 22.5.2009

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Lukáš Müller
Student(ka)

RNDr. Zbyněk Zdráhal, CSc.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.10.2008

doc. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Cílem diplomové práce byla charakterizace současného stavu analýzy proteomu piva se zaměřením na moderní instrumentální metody analýzy proteinů, zejména na možnosti identifikace proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie.

V praktické části byly identifikovány proteiny nacházející se ve vybraných vzorcích piva po jejich separaci 2-D elektroforézou. K identifikaci proteinů byla využita data získaná pomocí MALDI MS/MS a LC-MS/MS. Identifikované proteiny bylo možno rozdělit do 6-ti skupin na serpiny a protein Z, trypsin/ α -amylázové inhibitory, bílkoviny pocházející z kvasinek, LTP, hordeiny a ostatní bílkoviny. Analýza proteomu poskytla identifikaci řady bílkovin, majících nezastupitelný význam, zejména pak při tvorbě pěny a zákalu, popřípadě také konečné chuti piva, kdy dotvářejí pocit plnosti, a kvality piva.

ABSTRACT

The aim of presented diploma thesis was to characterize recent knowledge in the field of beer proteomics. The main part of this work was focused on modern instrumental methods of protein analysis, especially on protein identification by mass spectrometry.

In experimental part proteins from selected beer samples were isolated, purified and separated by 2-D electrophoresis. Protein identification was performed by MALDI MS/MS and LC-MS/MS. Identified proteins were divided into 6 groups - serpines and protein Z, trypsin/ α -amylase inhibitors, yeast proteins, LTP protein, hordeins and other proteins. Proteomic analysis provided identification of proteins important for analytical and sensory characteristics of the beer - for final beer quality and taste

KLÍČOVÁ SLOVA

proteiny piva, separace proteinů, MALDI-MS/MS, LC-MS/MS

KEYWORDS

beer proteins, protein separation, MALDI-MS/MS, LC/MS/MS

MÜLLER, L. *Analýza proteomu piva pomocí hmotnostní spektrometrie*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009. 81 s. Vedoucí diplomové práce RNDr. Zbyněk Zdráhal, Dr.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis diplomanta

Touto cestou bych chěl poděkovat RNDr. Zbyňku Zdráhalovi, Dr. za významnou pomoc při tvorbě této práce.

OBSAH

1. Úvod.....	- 11 -
2. Teoretická část.....	- 12 -
2.1 Výroba piva.....	- 12 -
2.1.1 Základní suroviny.....	- 12 -
2.1.1.1 Sladovnický ječmen	- 12 -
2.1.1.2 Chmel	- 12 -
2.1.1.3 Voda	- 13 -
2.1.2 Výroba piva.....	- 13 -
2.1.2.1 Výroba sladu	- 13 -
2.1.2.2 Změny složení bílkovin během výroby sladu	- 15 -
2.1.2.3 Vlastní výroba piva	- 15 -
2.1.2.4 Změny bílkovinného složení během procesu rmutování.....	- 17 -
2.2 Typy a druhy českého piva.....	- 18 -
2.2.1 Skupiny piv	- 18 -
2.2.2 Podskupiny piv	- 18 -
2.3 České pivo	- 19 -
2.4 Významné látky obsažené v pivě	- 20 -
2.4.1 Cukry	- 20 -
2.4.2 Alditoly a alkoholy	- 21 -
2.4.3 Deriváty nukleových kyselin	- 22 -
2.4.4 Anorganické a organické ionty	- 22 -
2.4.5 Vitaminy.....	- 22 -
2.4.6 Fenolické sloučeniny	- 23 -
2.4.7 Hořké chmelové látky	- 23 -
2.4.8 Sloučeniny síry.....	- 24 -
2.4.9 Aminy	- 25 -
2.4.10 Bílkoviny, peptidy a aminokyseliny.....	- 25 -
2.4.10.1 Protein Z.....	- 26 -
2.4.10.2 Lipid Transfer Protein 1	- 26 -
2.4.10.3 Bílkoviny vázající lipidy	- 27 -
2.4.10.4 Hordeiny.....	- 27 -
2.5 Hmotnostní spektrometrie	- 28 -
2.5.1 Proteomika a hmotnostní spektrometrie.....	- 30 -
2.5.2 Metody hmotnostní spektrometrie užívané při charakterizaci proteomu.....	- 30 -
2.5.3 Metody identifikace a způsoby fragmentace peptidů.....	- 32 -
3 Experimentální část	- 34 -
3.1 Použité chemikálie, přístroje a materiál	- 34 -
3.1.1 Použité chemikálie	- 34 -
3.1.2 Přístroje	- 34 -
3.1.3 Software	- 35 -
3.1.4 Vzorky.....	- 35 -
3.2 Příprava vzorků	- 36 -
3.2.1 Úprava vzorků	- 36 -
3.2.2 Odsolení	- 36 -
3.2.3 2D gelová elektroforéza	- 36 -

3.2.4 In-gel digesce	- 37 -
3.3 MS analýza	- 37 -
3.3.1 MS detekce	- 37 -
3.3.2 Zpracování dat	- 38 -
4 Výsledky	- 39 -
4.1 Výsledky proteomické analýzy ve vzorku piva Gambrinus	- 40 -
4.2 Výsledky proteomické analýzy ve vzorku piva Primus	- 41 -
4.3 Výsledky proteomické analýzy ve vzorku piva Pilsner Urquell	- 42 -
4.4 Výsledky proteomické analýzy ve vzorku piva Heineken	- 43 -
5 Diskuse	- 51 -
6 Závěry	- 53 -
7 Seznam použitých zdrojů a literatury	- 54 -
8 Seznam použitých zkratk a symbolů	- 56 -
9 Seznam příloh	- 57 -

1. Úvod

Pivo je tradičním a populárním nápojem, který má na území Česka dlouhou tradici. Je řazen mezi nápoje s relativně nízkým obsahem alkoholu – 30 – 50 g/l [1]. Obsahuje významné množství velmi kvalitní vody, takže se jedná o výrazně zavodňující nápoje, dále obsahuje také sacharidy v podobě tzv. „rychlých kalorií“, bílkoviny, hořké látky chmele, polyfenolické sloučeniny, oxid uhličitý, vitamíny a minerální látky.

Pivo obsahuje přibližně 500 mg/l bílkovinného materiálu [2], a to včetně polypeptidů s molekulovou hmotností menší než 5000 a větší než 100000. Hlavní společnou vlastností bílkovin piva je jejich stabilita v průběhu sladařského a pivovarského procesu a odolnost především k vyšším teplotám, extrémním hodnotám pH a proteolýze. Do finálního výrobku se tak z velké škály bílkovin, které obsahují vstupní suroviny, dostane pouze část [2].

Od 31. července 2008 existuje v rámci evropské unie chráněné zeměpisné označení „České pivo“. Používání tohoto zeměpisného označení je informací také zákazníkům v tuzemsku i v zahraničí, že výrobek pochází ze schváleného území, k jeho výrobě byly použity tradiční suroviny, že byl vyroben tradiční českou technologií a že výsledné senzorické i analytické charakteristiky odpovídají schváleným standardům.

Cílem předložené práce je přispět k poznatkům o bílkovinném složení ve zkoumaných vzorcích piva analýzou pomocí hmotnostní spektrometrie. Bílkoviny obsažené v pivě mají nezastupitelný význam, zejména pak při tvorbě pěny a zákalu, popřípadě také konečné chuti piva, kdy dotvářejí pocit plnosti, a kvality piva.

2. Teoretická část

2.1 Výroba piva

2.1.1 Základní suroviny

2.1.1.1 Sladovnický ječmen

Pro výrobu sladu se na našem území pěstují vybrané odrůdy jarního, dvouřadého ječmene *Hordeum distichum* var. *nutans*. Pro účely sladařského průmyslu se využívá ječné zrnko - obilka, která se skládá z obalových částí (pluch a plušek), zárodku (klíčku, embrya), z něhož při klíčení vycházejí podněty k aktivaci enzymů v celém zrně, a z endospermu, který zaujímá největší část obilky. Z fyziologických znaků je důležitá klíčivost a klíčivá energie, která udává procentuální podíl zrn schopných vyklíčit za stanovených podmínek během 3 až 5 dnů. Při chemickém rozboru se sleduje především obsah vody, škrobu, celkových extraktivních látek a bílkovin. Kvalitní odrůdy ječmene obsahují 62 až 65 % škrobu v sušině. Ječný škrob obsahuje větší podíl rozvětveného amylopektinu (80 %) než lineární amylozy. Ječmen ihned po sklizni není schopen klíčit a po dobu několika týdnů posklizňově fyziologicky dozrává. Důležitý je přístup kyslíku. U nás pěstované odrůdy mají posklizňové dozrávání 4 až 5 týdnů [3].

2.1.1.2 Chmel

Chmel, přesněji usušené hlávky samčích rostlin chmele evropského *Humulus lupulus* var. *europaeus* - dodává pivu typickou hořkou chuť, přispívá k tvorbě charakteristického aroma a má další technologicky důležité vlastnosti [3]. Chmel v České republice se pěstuje ve třech oblastech a to v oblasti Žatecké, Úštěcké a Tršické [4].

Pro kvalitu chmele je rozhodující obsah pivovarsky cenných složek, zejména pryskyřic, polyfenolů a silic. Současně je nutný nízký obsah cizorodých látek pocházejících z ochranných postřiků a dusičnanů jako přirozené složky. Chmelové pryskyřice jsou původcem hořké chuti. Chmelové polyfenoly se uplatňují v průběhu technologie při srážení vysokomolekulárních bílkovin a chmelové silice vytváří charakteristické chmelové aroma [3].



Obr. 2.1 - Chmelařské oblasti v České republice Žatecká oblast (A), Ústěcká oblast (B) a Tršicko (C). Obrázek převzat z [4] a upraven.

2.1.1.3 Voda

Voda je ve sladařství a pivovarském průmyslu důležitou surovinou, neboť přímo ovlivňuje kvalitu piva a má i jinak široké uplatnění a spotřebuje se jí celkově velké množství. Je nutno podotknout, že ačkoliv můžeme mít stejný postup výroby, stejné kultury kvasinek, nikdy neuvaříme stejné pivo s jiným zdrojem vody [3].

2.1.2 Výroba piva

Výrobu piva můžeme rozdělit do 2 fází

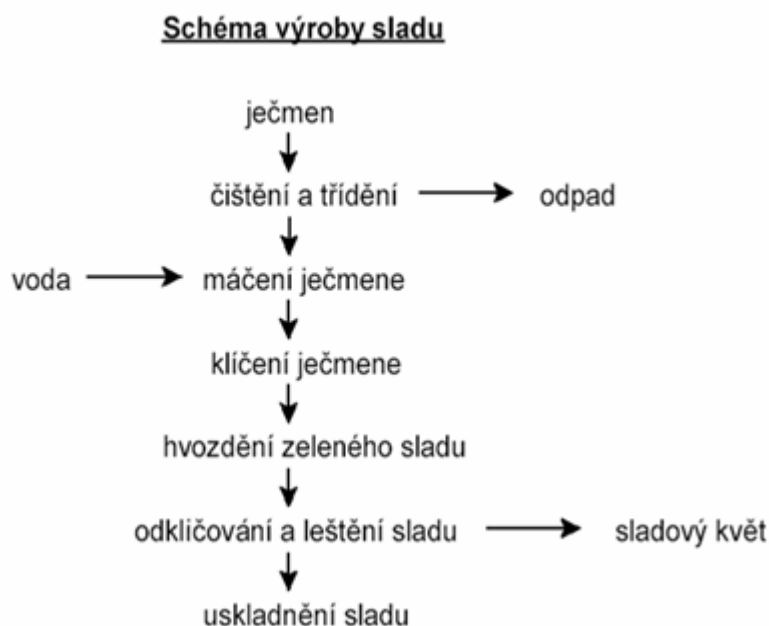
- výroba sladu
- vlastní výroba piva

2.1.2.1 Výroba sladu

Cílem sladování je vyrobit řízeným procesem klíčení a hvozdění z ječmene slad, obsahující potřebné enzymy a aromatické i barevné látky nezbytné pro výrobu určeného druhu piva. Principem sladování je vytvoření optimálních podmínek pro klíčení ječmene, při němž dochází v zrna k aktivaci a tvorbě technologicky důležitých enzymů, především cytologických, proteolytických a amylolytických, při zamezení ztrát potlačením růstu.

Tím vzniká zelený slad, který se s následným hvozděním, při kterém se působením zvýšené teploty vyvolají chemické reakce tvorby aromatických a barevných látek, přemění v hotový slad [3].

Technologický postup výroby sladu má tyto etapy (Obr. 2.2)



Obr. 2.2 - Schéma výroby sladu [3]

Čistění a třídění ječmene

Sladovnický ječmen je při dodání třeba zvážít, zbavit nežádoucích příměsí a roztřídit podle velikosti zrna. Třídění zrna podle velikosti zrn probíhá na soustavě sít. Po vytřídění je nutno zrna uskladnit v silech po dobu nejméně šesti týdnů, v té době se odbourávají látky, které brání zrnu v klíčení. Při skladování se čerstvě sklizený a vytříděný ječmen nachází ve stadiu základního klidu, tzv. dormance, a není schopen rychle vyklíčit. Špatná klíčivost čerstvě sklizeného ječmene je způsobena přítomností inhibitorů klíčení, tzv. dormitů. Teprve jejich odbouráním oxidací dormance zaniká, uvolňuje se činnost stimulatorů klíčení giberelinů, a zrna se stává schopné vyklíčit [3].

Máčení

Cílem máčení je zvýšení obsahu vody v ječném zrnu z 12 až 15 % na 42 až 48 %. Dosažení obsahu vegetační vody je nezbytné pro enzymové pochody zajišťující optimální průběh sladařského klíčení. Důležitá je taktéž přítomnost kyslíku pro aerobní dýchání zrna. Ječmen se namáčí v namáčecích náduvnících, kdy dochází k dodání vody potřebné ke klíčení. Tento proces trvá dva dny [3].

Klíčení

Sladařské klíčení ječmene je aktivace, tvorba enzymů a dosažení požadovaného stupně rozluštění při omezení ztrát vegetací. Klíčení je fyziologický proces, při kterém se v zárodečné části zrna vyvíjejí zárodky kořínků a listů za využití zásobních látek z endospermu. Klíčení sladovnického ječmene klasickým způsobem se provádí na humnech, což jsou hladké podlahy v prostorných místnostech s účinným větráním. Klíčení probíhá na hromádách ve vrstvě asi 80 cm, při teplotě cca 14 °C, po dobu 5-7 dní. Během klíčení jsou hromady dvakrát

denně obraceny, tím je dodáno dostatečné množství vzduchu pro klíčení a zabraňuje se tak srůstání klíčících obilek. Výsledným produktem klíčení je tzv. zelený slad [3].

Hvozdění

Při hvozdění se snižuje obsah vody ve sladu pod 4%. Dochází k zastavení vegetačních pochodů při zachování požadované enzymové aktivity a vytvoření chuťových, barevných a oxidoredukčních látek tvořící charakter sladu. Dosahuje se toho nejprve řízeným a šetrným způsobem sušení v nadbytku vzduchu při teplotách 20-60 °C a v další fázi, hvozděním v slabém proudu horkého vzduchu při teplotách 60-80 °C u světlého sladu a 60-105 °C u tmavého sladu [3].

Odkličování

Slad po hvozdění se zbaví sladových klíčků, které jsou pro další zpracování bezcenné. Odklíčený slad se chladí a je dopravován do sil, kde se nechává šest týdnů odležet před vlastním zpracováním [3].

2.1.2.2 Změny složení bílkovin během výroby sladu

Zhruba 2/3 zásobních proteinů ječmene jsou lokalizovány v relativně inertní části endospermu. Je zřejmé, že během hydrolýzy jsou zásobní bílkoviny přeměněny na peptidy, popřípadě častěji až na aminokyseliny. Nejvíce jsou degradovány hordeinové bílkoviny, zatímco u glutelinů, albuminů a globulinů dochází během tvorby sladu jenom k nevýznamným kvantitativním změnám. Štěpení ječných proteinů lze v tomto případě rozdělit na tři fáze. Nejprve jsou bílkoviny svrchních vrstev ječmenného zrna degradovány pomocí proteáz a karboxypeptidáz. Tím dochází k produkci aminokyselin potřebných pro syntézu enzymů umožňující úpravu endospermu. V druhé fázi jsou hydrolyzovány zásobní enzymy endospermu, čímž dochází k další tvorbě potřebných aminokyselin. V poslední fázi dochází k depolymerizaci bílkovinné části nacházející se ve středu zrna.

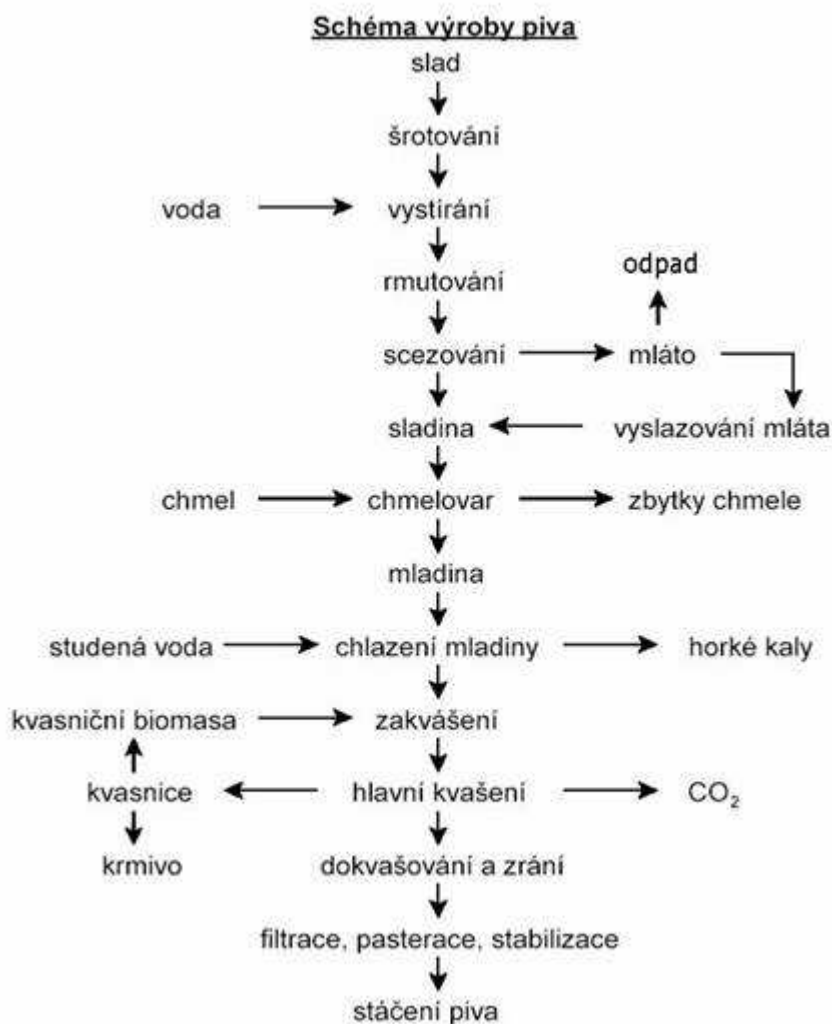
Proteolytická aktivita je velice významným faktorem. Při výrobě sladu je tak uvolňováno do kapaliny značné množství aminokyselin. Ty poté mohou dále sloužit jako výživa pro kvasinky, pro tvorbu biomasy, nebo mohou tvořit základ pro aroma finálního výrobku. V posledních letech také vychází najevo, že to jsou právě residua bílkovin, které zapříčiňují tvorbu a stabilitu pěny a zákalu piva [5].

2.1.2.3 Vlastní výroba piva

Výroba mladiny

Odleželý slad se zbaví prachových podílů a rozdrť se na sladový šrot. V průběhu vystírání je sladový šrot dokonale rozmíchán s vystírací vodou. Vzniklá směs tzv. rmut je postupně vyhříván na technologicky významné teploty - 52, 63, 75 °C. Tyto teploty jsou ideální pro působení enzymů, které mění především škroby a bílkoviny na zkvasitelné cukry, dextriny a polypeptidy. Důležité je i štěpení vysokomolekulárních bílkovin. Bílkoviny jsou důležité pro pěnivost piva a plnost chuti a jejich štěpné produkty - aminokyseliny jsou důležité pro kvašení. Proces vystírání a rmutování probíhá ve rmutovystírací pánvi, což je nádoba z nerezové oceli, vytápěná parou a vybavená výkonným míchadlem. Celý proces trvá čtyři hodiny. V tomto procesu vzniká sladina, kterou je nutno přefiltrovat na sladinovém filtru.

Nerozpuštěným částem se říká mláto a je to odpad vznikající při výrobě piva. Sladina se dále vaří s chmelovými preparáty a dochází k převedení hořkých chmelových látek do roztoku, dále k upravení koncentrace odpařením části vody. Výsledným produktem chmelovaru je mladina. Tento proces probíhá na zařízení, kterému se říká mladinová pánev, jedná se o nerezovou nádobu vybavenou teplosměnnými plochami a vytápěnou parou. Při chlazení mladiny je třeba odseparovat tzv. hořké kaly, které vznikly při chmelovaru. Toto probíhá ve vířivé kádi, kde se kaly usadí na dno, odtud je mladina odčerpávána a ochlazována na zákvasnou teplotu 8-10 °C [3].



Obr. 2.3 - Schéma výroby piva [3]

Jinou možností je využití moderních technologií vycházejících z výroby koncentrovaných mladin o vysoké hustotě – označované jako „High Gravity Brewing“ (HGB) technologie. U této technologie se dosahuje koncentrací mladiny 15 – 25 % hm., na rozdíl od běžných (nizkohustotních mladin - LG) kde se koncentrace pohybuje mezi 10 – 15 % hm. Při použití této technologie se však podle kritiků ze surovin extrahuje do sladiny méně látek důležitých pro pивní pěnu [6].

Procesy kvašení a dokvašování

Pro kvašení mladiny se používají dva druhy kvasinek. Svrchní pivovarské kvasinky při teplotách až 24 °C, nebo spodní pivovarské kvasinky při teplotách kvašení 6 - 12 °C [3]. Kvasnice byly dříve rozdělovány na dvě základní skupiny. Na kvasnice používané při spodní fermentaci nazvané na počest jejich objevitele Emila Hansena z dánského Carslebergu *Saccharomyces carlsbergensis* a na kvasnice používané při svrchním kvašení. Nově byly oba druhy zařazeny pod *Saccharomyces cerevisiae* [7].

Kvašení mladiny je při klasické technologii rozděleno do dvou fází, na hlavní kvašení a dokvašování [3]. Hlavní kvašení se u nás provádí obvykle v otevřených kvasných kádích spodními pivovarskými kvasinkami. Nejdůležitějšími reakcemi hlavního kvašení jsou přeměny zkvasitelných sacharidů glukózy, maltózy a maltotriózy na etanol a oxid uhličitý anaerobním kvašením. Současně se v malé míře tvoří vedlejší kvasné produkty, alifatické alkoholy, aldehydy, diketony, mastné kyseliny a estery. Všechny tyto látky a jejich významný poměr spolu vytváří chuť a aroma piva. Toto kvašení probíhá v prostorách, které se nazývají spilky. Kvašení probíhá v kvasných tancích, opatřených duplikátory s přívodem studené vody pro řízení chlazení kvasící mladiny. Tanky jsou plněny zchlazenou mladinou, v průběhu plnění je mladina provzdušněna sterilním vzduchem a jsou do ní přidány pivovarské kvasinky. Proces hlavního kvašení trvá 5-7 dní podle stupňovitosti vyráběného piva a v jeho průběhu se udržuje maximální teplota kvasící mladiny na 11 °C. Na konci hlavního kvašení sedimentují spodní kvasinky na dno kvasné kádě a po stáhnutí piva se sbírají, propírají se studenou vodou a znovu se nasazují do provozu. Po ukončení kvašení se obsah tanku zchladí na 5-7 °C a mladé pivo je přesunováno do ležáckého sklepa [3].

Dokvašování a zrání mladého piva se provádí v ležáckém sklepě, kde se pivo při teplotách 1 – 3 °C velmi pozvolna dokvasí, číří se, zraje a sytí se pod tlakem vznikajícího oxidu uhličitého v uzavřených ležáckých tancích. Vznikající oxid uhličitý se nejprve hromadí v prostorách nad pivem a vytváří přetlak, posléze se začíná vázat na bílkovinné složky piva a tím vytváří jeho charakteristický říz. Doba ležení je závislá na typu piva. U běžných piv obvykle trvá tři týdny a koncentrace oxidu uhličitého dosahuje ca 10%, pro speciální exportní piva se prodlužuje až na několik měsíců.

Dokonale vyztřelé pivo se musí ještě zfiltrvat, případně pasterovat či stabilizovat a nakonec se stáčí do transportních obalů [3].

2.1.2.4 Změny bílkovinného složení během procesu rmutování

Měřením bylo zjištěno, že většina aminokyselin vyextrahovaných v mladině pochází z větší části z procesu sladování. Nicméně během procesu rmutování dochází k dalšímu zpracování bílkovinného podílu a to dvoustupňovým procesem. V první fázi dochází k solubilizaci následovanou hydrolýzou bílkovin zejména na peptidy. V druhé fázi jsou peptidy v hojné míře konvertovány pomocí karboxypeptidázy na aminokyseliny. Z výsledků stanovení je patrné, že přibližně 60 % bílkovinného materiálu se nachází ve formě aminokyselin a 20 % v podobě peptidů. Zbytek tvoří vysokomolekulární polypeptidy mající pozitivní vliv při tvorbě zákalu [5].

2.2 Typy a druhy českého piva

Původní členění piv podobně jako dnes vycházelo ze stupňovitosti (koncentrace) původní mladiny, která se určovala výpočtem z obsahu alkoholu a skutečného extraktu a udávala se v hmotnostních procentech (% hm.). Podle toho se piva dělila na výčepní (do 10 % hm.), ležáky (11 – 12,5 % hm.) a piva speciální (nad 12,5 % hm.). Se stupňovitostí piva souvisel i obsah alkoholu, udávaný v objemových procentech (% obj.). Tak např. 8% piva mívala přibližně 2 % obj. alkoholu, 10% výčepní piva okolo 3 % obj. alkoholu a 12% ležáky 3,5 – 4 % obj. alkoholu, ale někdy i více. Toto rozdělení piv bylo v roce 1997 nahrazeno novým, zvyklostem Evropské unie lépe vyhovujícím, dělením piv podle barvy na čtyři skupiny a podle extraktu původní mladiny před zakvašením (EPM; blíže přílohy č. 1 a 2 vyhlášky č. 468/2003 Sb. zákona č. 156/2003 Sb.), obsahu alkoholu či způsobu konečné úpravy na 11 podskupin (§12 oddílu 3 vyhlášky č. 335/1997 Sb. zákona č. 111/1997 Sb.). Tento způsob členění piv byl v roce 2000 mírně pozměněn (§11 a §12 oddílu 3 vyhlášky č. 45/2000 Sb. zákona č. 16/2000 Sb.) a v této podobě platí dodnes [8]. Vypadá následovně:

2.2.1 Skupiny piv

- a) světlá – piva vyrobená převážně ze světlých sladů
- b) polotmavá – piva vyrobená z tmavých sladů, sladů karamelových, případně barevných sladů ve směsi se světlými slady
- c) tmavá
- d) řezaná – piva vyrobená při stáčení smíšením světlých a tmavých piv stejné skupiny

2.2.2 Podskupiny piv

- a) lehká – piva vyrobená převážně z ječných sladů, do 7 % hm. EPM, obsah využitelné energie max. 1300 kJ/l (na etiketě musí být uveden i obsah sacharidů, tuků a bílkovin a energetická hodnota musí být označena nejen v kJ/l, ale též v kcal/l)
- b) výčepní – piva vyrobená převážně z ječných sladů, 8 až 10 % hm. EPM
- c) ležáky – piva vyrobená převážně z ječných sladů, 11 až 12 % hm. EPM
- d) speciální – piva vyrobená převážně z ječných sladů, 13 a více % hm. EPM
- e) portery – tmavá piva vyrobené převážně z ječných sladů, 18 a více % hm. EPM
- f) se sníženým obsahem alkoholu – piva s obsahem alkoholu nejvýše 1,2 % obj. (1 % hm.)
- g) se sníženým obsahem cukrů – hluboce prokvašená piva s obsahem alkoholu do 0,75 g / 100 ml a bílkovin do 0,4 g / 100 ml
- h) pšeničná – piva vyrobená s podílem extraktu z použitého pšeničného sladu vyšším než jedna třetina hmotnosti celkově dodaného extraktu
- i) kvasnicová – piva vyrobená dodatečným přidavkem podílu rozkvašené mladiny do hotového piva v průběhu stáčení (Pozn.: Tímto se liší od tzv. nefiltrovaných piv, do kterých žádné kvasnice přidávány nejsou. Kvasnice jsou v nich přítomny pouze ve formě neodfiltrovaného zbytku po kvašení.)
- j) nealkoholická – piva s obsahem alkoholu nejvýše 0,5 % obj. (0,4 % hm.)
- k) ochucená – s přidavkem látek určených k aromatizaci (bylin nebo bylinných výluhů, ovocného koncentráту, přírodního aroma, medu aj.), potravních doplňků popř. lihovin nebo

jiných alkoholických nápojů (s obsahem alkoholu od 1,2 do 15 % obj. alkoholu, kromě vína a burčáku). Podíl lihovin a jiných alkoholických nápojů nesmí překročit 10 % obj.

Podle způsobu kvašení je možno dále dělit piva na svrchně nebo spodně kvašená. Svrchní kvašení probíhá při 15 – 24 °C [9] a s využitím kvasinek *Saccharomyces cerevisiae subsp. cerevisiae* popř. spontánní mikroflóry mléčných nebo octových bakterií. Využívá se k výrobě veškerých pšeničných piv. Samotné kvašení trvá nejdéle tři až čtyři dny. Vznikající kvasnice jsou z hladiny kádě sbírány a zkvašená mladina se následně ukládá do sudů anebo do tanků, kde dozrává za přirozené či sklepní teploty po dobu několika dní až měsíce [8].

K obvyklému problému svrchního kvašení patří spojování kvasinek s bakteriemi z okolního ovzduší, což znemožňovalo historicky používat tuto metodu v letním období. V současnosti je technicky možné kontrolovat teplotu a okolní atmosféru uměle, takže je možné využívat svrchní kvašení po celý rok. Toto mělo za následek oživení této metody v současnosti.

Spodní kvašení probíhá při teplotách nižších (8 – 14 °C) a s použitím kvasinek *Saccharomyces cerevisiae subsp. uvarum (carlsbergensis)* [10].

Třetím typem, v historii jediným způsobem kvašení piva je spontánní kvašení piva - zkvasí se tím, co je ve vzduchu a tím co zbude v sudech po předchozí várce. V dnešní době jsou tato piva nejvíce rozšířena v Belgii, v některých částech Francie a Nizozemí [10].

2.3 České pivo

Od 31. července 2008 bylo přiznáno tuzemským pivům v rámci Evropské unie chráněné zeměpisné označení „České pivo“. Používání tohoto zeměpisného označení je informací také zákazníkům v tuzemsku i v zahraničí, že výrobek pochází ze schváleného území, k jeho výrobě byly použity tradiční suroviny, byl vyroben tradiční technologií a výsledné senzorycké i analytické charakteristiky odpovídají schváleným standardům [11].

Vedle určitého technologického postupu se české pivo vyznačuje i specifickými vlastnostmi, které mu dávají vedle metody vaření zejména tradiční suroviny používané při jeho výrobě. Na území České republiky se podle odborníků po staletí vaří převážně spodně kvašené, řádně prozřálé pivo, které se vyznačuje velmi dobrou "pitelností". Oproti jiným pivům je to české charakteristické vyšším podílem nezkvašeného extraktu, větším množstvím polyfenolů, vyšším pH, výraznější barvou i hořkostí. České pivo je natolik specifické, že pivovarští odborníci jsou schopni ho identifikovat i bez pomoci laboratorní techniky.

Jedná se tedy o pivo vyrobené tradiční českou technologií s podílem českých surovin vyrobené na vymezeném území České republiky. Musí být vyrobeno z českého sladu plzeňského typu vhodného pro výrobu českého piva. Jedná se o slad ze šlechtěného ječmene, jehož hlavní výsadou je vyšší obsah škrobu, umožňující při procesu kvašení dodržovat zásadu vyššího zbytkového extraktu vytvářející nezaměnitelnou chlebovou chuť a plnost českého piva. Odrůdy vhodné pro slad musí být v ČR vyšlechtěny, pěstovány a odzkoušeny. Nejnovější takovéto odrůdy jsou Bojos, Malz a odrůda Radegast. Pivo nesoucí značku „České pivo“ musí být vyrobeno minimálně z 80 % z českého sladu. Další podmínkou je například také nepoužívání infuzního způsobu rmutování. Při infuzní technologii se používá pára o 2 atm a 120°C a celý proces trvá 20 – 30 minut oproti dekokčnímu postupu trvajícímu okolo 5 – 6 hodin. Dekokční postup, užívaný v ČR, zjednodušeně znamená, že rmut se nevaří najednou ale v několika fázích, v několika nádobách a při různých teplotách: Přesněji se jedná o dvoufázové kvašení, jedním z nich je proces zrání v ležáckých sklepích (viz. kap. 2.1.2.3).

Pivo je tak více nasyceno oxidem uhličitým, je více chutné a dostatečně pitelné. Vlastností českého piva je právě pitelnost, ke které přispívá také neprokvašený zbytkový extrakt. Další podmínkou pro udělení označení „České pivo“ je také přesně daný podíl českého chmele, kterého musí být minimálně 30 % u ležáku a 15 % u výčepního piva. Nízká procentuální hodnota na požadavek množství českého chmele u českého piva je z důvodu vysoké ceny českého chmele. Jeho zvýšení by tak zdražovalo finální výrobek a to minimálně na trojnásobek. Chmel se může používat jak v šiškové formě (nejméně používaná varianta), tak granulovaný či peletový chmel (rozemleté, popřípadě slisované šišky). Pouze pivo vyrobené na českém území může být označeno touto zeměpisnou značkou. Piva vyrobená stejnou technologií v licenci na jiném území již tuto značku používat nemohou. Českým územím se myslí území celé České republiky s výjimkou pohraničních hor, což zahrnuje veškeré pivovary na území ČR a přilehlé oblasti pěstování ječmene.

2.4 Významné látky obsažené v pivě

2.4.1 Cukry [2]

Pivo obsahuje 3,3 – 4,4 % cukrů (z toho 75 – 80 % dextrinů, 20 – 30 % monosacharidů a oligosacharidů a 5 – 8 % pentozanů). V moderním pivovarnictví je sledování množství cukrů v mladině a pivě velice důležité. Primárním zdrojem jednoduchých cukrů jsou škrob, arabinoxilan a β -glukan, společně se sacharózou.

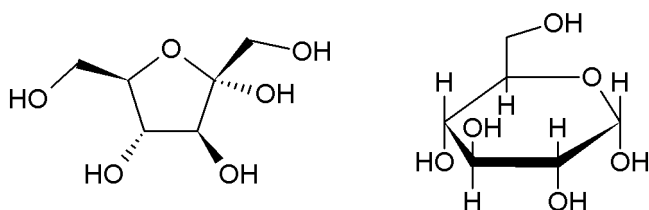
Po fermentaci patří mezi cukry obsahující méně než čtyři glukosy poté zejména D-glukosa a D-fruktosa, tvořící 9 – 10 % veškerých cukrů obsažených v mladině. Dalšími monosacharidy jsou D-ribosa, L-arabinosa, D-xylosa a v menším množství také D-galaktosa. Hlavními disacharidy jsou maltosa (ca. 14% celkového obsahu cukrů v mladině) a sacharosa (ca. 5% celkového obsahu cukrů v mladině). Většina sacharosy pochází ze sladu, zatímco ca 97 % maltosy vzniká během procesu rmutování. Mezi další disacharidy patří také isomaltosa, kojibiosa, nigerosa a maltulosa.

Nejdůležitějším trisacharidem obsaženým v pivě je maltotriosa, která představuje 14 % z celkového obsahu cukrů. Dále také můžeme najít menší množství iso-maltosy, panosy a iso-panosy. Hlavní podíl trisacharidů (96 %) je vyprodukovan během rmutování.

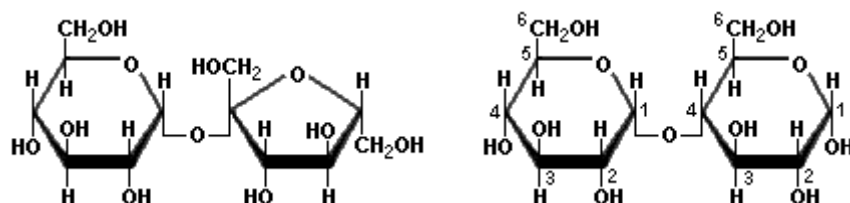
Hlavním zdrojem fermentovatelných cukrů v pivě jsou obiloviny s vysokým obsahem škrobu, zejména poté pšenice. Jejich sladivost a typické množství jsou uvedeny v tabulce 2.1.

Tab. 2.1 - Relativní sladkost a typický obsah některých jednoduchých cukrů obsažených v pivě (sladkost je vztažena k sacharose (= 1)) [2]

cukr	relativní sladkost	obsah (g/l)
fruktosa	1,1	0-0,19
glukosa	0,7	0,04-1,1
sacharosa	1,0	0-3,3
maltosa	0,5	0,7-3,0
maltotriosa	0,5	0,4-3,4



Obr. 2.4 - D-fruktóza (vlevo) a D-glukóza (vpravo)



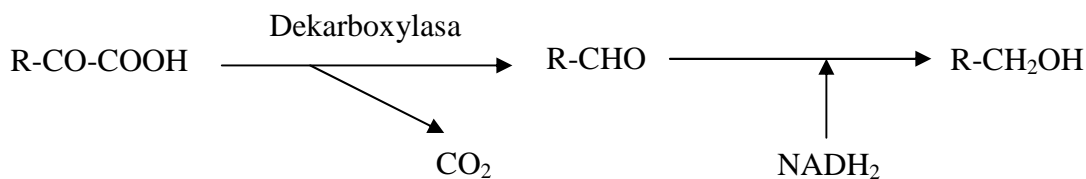
Obr. 2.5 - Sacharosa (vlevo) a maltosa (vpravo) [12]

2.4.2 Alditoly a alkoholy [2]

Tab. 2.2 - Obsahy vybraných alkoholů nacházejících se v pивě [2]

Alkohol	obsah (mg/l)
metanol	0,5-3,0
etanol	20,000-80,000
1-propanol	3-16
2-propanol	3-6
2-methylbutanol	8-30
3-methylbutanol	30-70
2-fenylethanol	8-35
1-okten-3-ol	0,03
2-decanol	0,005
glycerol	1200-2000
tyrosol	3-40

Řada alkoholů obsažených v pивě ovlivňuje také jejich chuť. Mezi nejdůležitější patří etanol, který je ve většině druhů pив obsažen v minimálně stonásobném množství než je obsah ostatních alkoholů (viz. tab. 2.2). Obsah alkoholu v pивě ve světě se pohybuje od 0,05% u nealkoholických pив až po 12,5% u britského Thomas Hardy Ale, který patří mezi nejsilnější pивa světa. Skladba alkoholů v pивě má také důležitý vliv na tvorbu dalších vedlejších produktů tvořených během fermentace pивa. Jejich tvorba je spřažena se syntézou proteinů u kvasinek, kdy jsou produkovány transaminací nebo deaminací aminokyselin obsažených v mladině, nebo jsou syntetizovány z cukrů nacházejících se v mladině. Keto-kyseliny jsou přeměňovány na vyšší alkoholy dekarboxylací a redukcí. Mezi další alkoholy nalezené například v Taiwanském pивě se řadí také myo-inositol, erythritol, xylitol, arabitol a manitol.



Obr. 2.6 - Tvorba vyšších alkoholů z keto kyselin [2]

2.4.3 Deriváty nukleových kyselin [2]

Nukleotidy v pivu pocházejí jak ze rmutu, tak z kvasinek a jejich působení během fermentace. Analýza purinových a pyrimidinovýchází je v současné době v popředí zájmu mnoha výzkumů. Na jedné straně jsou tyto sloučeniny považovány za látky způsobující „off-flavour“ potravin, což může být jakýmsi ukazatelem čerstvosti dané potraviny. Na druhé straně konečným produktem odbourávání purinu je kyselina močová, řadící se mezi hlavní příčiny tvorby dny.

2.4.4 Anorganické a organické ionty [2]

Množství anorganických látek nacházejících se v pivu se pohybuje v rozmezí od 0,5 do 2 g/l. Z výsledků stanovení bylo zjištěno, že tyto minerální látky, zahrnující převážně kationty stopových prvků a anionty, ovlivňují jak chuť, tak čírost konečného produktu. Samozřejmostí je, že tyto prvky jsou zde původní a pocházejí jenom ze surovin používaných při výrobě piva.

Soli se podílejí zejména na tvorbě slané chuti, která je přímo závislá na jejich složení. V dnešní době hodně pivařských společností využívá množství různých zdrojů vody a kvůli její standardizaci ji často deionizují a poté teprve zpětně přidávají potřebné ionty. Velká pozornost je věnována koncentraci chloridových a sulfátových iontů. Chloridové ionty přidávají vyzrálост a plnost chuti, zatímco sulfáty způsobují suchý charakter piva. Mezi další významné ionty lze také zařadit fosfáty, oxaláty, mravenčany, octany, citráty, sukcináty, pyruváty, acetáty, laktáty a pyroglutamáty.

2.4.5 Vitaminy

Pivo obsahuje malé množství vitaminu skupiny B (niacin, B1 – tiamin, B2 – riboflavin, B4 – adenin, B5 – pantotenová kyselina, B6 – pyridoxin, B7 – biotin, B8 – inositol, B12 – kyanokobalamin). Jejich důležitost při výrobě piva je jejich adekvátní obsah v mladině, zabezpečující kvalitní působení kvasinek. Vitaminy skupiny B, zejména biotin, inositol a pantotenová kyselina, jsou důležitým růstovým faktorem kvasinek během fermentace.

Mladina je bohatým zdrojem vitaminů, a přestože se nároky na množství vitaminů kvasinek během jejich růstu mění, obsahuje jich dostatečné množství a různorodost. Zejména se zde vyskytují biotin, tiamin, nikotinová kyselina, riboflavin, panthotenát vápenatý, inositol, pyridoxin, pyridoxal a pyridoxamin. Kromě inositolu, který má strukturní roli při syntéze membrány, mají všechny vitaminy katalytickou funkci jako koenzym.

Dalším vitaminem, který je často do piva přidáván je kyselina L-askorbová, mající zde funkci antioxidantu, popřípadě levnější náhrada kyselina erythorbová [2] (isoaskorbová kyselina; stereoisomer askorbové kyseliny [13]).

2.4.6 Fenolické sloučeniny [2]

Pivo obsahuje velké množství fenolických sloučenin, jejichž množství se pohybuje podle typu od 150 mg/l do 350 mg/l. Asi 2/3 z nich pocházejí přímo ze sladu a bývají nejčastěji klasifikovány jako částečně těkavé, nebo netěkavé látky zahrnující

- a) jednoduché monofenoly a monomery polyfenolů
- b) oligomery a polyfenoly

Díky jejich schopnosti ovlivňovat barvu, chuť a stabilitu piva, se tyto sloučeniny dostávají do popředí zájmu pivovarnického odvětví.

Jednoduché fenoly a polyfenoly jsou extrahovány během vaření mladiny a pocházejí jak ze sladu, tak z chmele. Velká část z nich reaguje s proteiny, zbytek podléhá velkému množství různých interakcí, z nichž některé produkty dávají pivu výslednou barvu.

Tab. 2.3 - Klasifikace fenolických sloučenin v pivě [2]

typ fenolu	příklad výskytu v pivě	běžná koncentrace v pivě (mg/l)
<i>Monofenoly</i>		10-30
fenolalkoholy	tyrosol	
fenolové kyseliny	ferulová kyselina	
aminy fenolu a aminokyseliny	hordeiny, tyrosin	
<i>monomery polyfenolů</i>		1-23
flavan-3-ol	katechin, epikatechin	
flavan-3,4-diol	leukokyanidin	
flavonoly	quercetin	
<i>kondensované polyfenoly</i>		20-140
dimery a polymery katechinu		
proanthokyanidiny	prokyanidin B3	
prodelphinidiny	delphinidin B3	

2.4.7 Hořké chmelové látky

Chmel obsahuje velké množství různých organických sloučenin (viz. tab. 2.4). V popředí zájmu jsou látky souhrnně označované jako chmelové pryskyřice, obsahující zejména kyseliny, oleje a polyfenoly. Složení chmelových pryskyřic je důležitým biochemickým ukazatelem při rozlišování různých odrůd chmelu. Chmelové kyseliny můžeme rozlišit na:

- α -kyseliny (humulony, cohumulony a adhumulony)
- β -kyseliny (lupulony, colupulony a adlupulony)

Jedná se o bledě dožluta zabarvené látky, slabé kyseliny, velice málo rozpustné ve vodě s poměrně málo hořkou příchutí. A-kyseliny jsou bez chuti, ale během vaření mladiny jsou izomerizovány na hořké iso- α -kyseliny, známé také jako isohumulonany [2]. Dalšími hořkými látkami jsou produkty přeměn iso- α -kyselin – oxidované formy označované jako abeo-iso- α -kyseliny, hydrogenované (redukováné) dihydro-, tetrahydro- a hexahydro-iso- α -hořké kyseliny, či hydrolyzované formy (např. kyselina humulinová). Oxidované formy vznikají především při chlazení horké mladiny, mají slabší hořkost, ale příznivě ovlivňují zejména přilnavost pěny [6].

Iso- α -kyseliny jsou v pivě přítomny v nízkých koncentracích (okolo 100 mg/l) a řadí se k primárním látkám ovlivňujících chuť (vedle etanolu a oxidu uhličitého). Nejnížší množství zajišťující hořkou chuť byla stanovena na 6 mg/l. Vlastní koncentrace nacházející se v pivě se pohybuje v rozmezí 10 – 100 mg/l. Rozpustnost těchto iso- α -kyselin v pivě je mnohem větší než α -kyselin, a to hlavně díky jejich nízkým pKa hodnotám (ve vodném mediu okolo 3) jsou iso- α -kyseliny přítomny většinou jako ve vodě rozpustné soli. Další významné vlastnosti iso- α -kyselin jsou:

- zvyšují povrchové napětí, čímž stabilizují pивní pěnu
- inhibují růst gram-positivních bakterií, čímž chrání pivo před těmito mikroorganismy [2]

Tab. 2.4 - Látky obsaženy v sušené chmelové šišce [2]

hlavní sloučeniny	koncentrace (% w/w)
α -kyseliny	2-7
β -kyseliny	2-10
esenciální oleje	0,5-3,0
polyfenoly, taniny	3-6
monosacharidy	2
aminokyseliny	0,1
proteiny	15
lipidy, mastné kyseliny	1-5
pektiny	2
popel, soli	10
celulosa, ligniny	40-50
voda	8-12

2.4.8 Sloučeniny síry

Nejběžnější sloučeninou síry v pivě je oxid siřičitý (SO_2), nacházející se většinou ve vázané formě a pod koncentracemi, které by mohly ovlivnit senzorické vlastnosti (20 mg/l). Většina těkavých sloučenin síry nacházejících se v pivě pochází původně z chmelu a tyto látky nejsou přímým důsledkem fermentace [2].

V pивu je známo okolo 50-ti těkavých sloučenin síry. Některé z nich jsou produktem metabolismu kvasinek. Významnou sloučeninou je například sirovodík, který může být produkován během rozkladu metioninu a cysteinu při autolýze kvasinek. Může být také syntetizován, v případě její přítomnosti v mediu, z molekuly síry. Množství produkovaného sirovodíku za daných podmínek může být ukazatelem pro charakterizaci daného kmene kvasinek. Další významnou složkou obsahující síru je dimetylsulfid (DMS) vznikající

z prekurzorů jako jsou S-metyl-methionin a D-dimetyl-sulfoxid. Nezvažuje se však možnost, že by kvasinky byli hlavním zdrojem DMS, který je spíše ve větší míře součástí surovin [5, 14].

2.4.9 Aminy [2]

V pivu bylo doposud identifikováno velké množství různých aminů, mezi nimiž má největší procento zastoupení amoniak. Bylo zjištěno, že tyto těkavé aminy se netvoří během fermentace, ale pocházejí původně ze sladu a použitého chmelu. Jejich množství poté závisí na podmínkách při rmutování a varu. Dokonce byly zjištěny rozdíly ve složení a množství těkavých aminů v různých pivech. Příkladem může být etylamin, který je hlavním aminem v amerických pivech, kdežto v Evropských je touto složkou dietylamin.

2.4.10 Bílkoviny, peptidy a aminokyseliny

Pivo obsahuje v průměru více proteinů než ostatní alkoholické nápoje, jako například víno, přesto je to méně než u takových nápojů jako je mléko [2].

Proteiny pocházejí původně zejména z ječmene, který jich obsahuje okolo 10 – 12 % a asi třetina z nich je poté extrahována během procesu rmutování [2]. Obsah bílkovin klesá již během sladování, kdy jsou využívány k výstavbě základů rostlinných těl, ke tvorbě kořínků a střílky zrna. Proto je obsah ve sladu nižší o přibližně 0,3 % oproti obsahu bílkovin v ječmeni. Do rozpustné formy je převedeno během klíčení asi 35 až 40 % bílkovin. Obsah dusíku je důležitou technologickou hodnotou ječmene určeného ke sladování – slad obsahuje 7 – 16 % bílkovin, přičemž 80 % proměnlivosti znaku je dáno agroekologickými podmínkami daného ročníku. Některé nově zaváděné (s odlišnými genetickými znaky) zahraniční odrůdy se nehodí pro výrobu českého piva. Na druhou stranu existují i odrůdy pozitivně ovlivňující stabilitu pěny piva a jeho vůni, a to na základě sníženého obsahu enzymu lipoxxygenázy (lipoxxygenase-1-less variants – označované LOX-less odrůdy) a inkorporací LOX-less znaku do vybraných odrůd. Chmelové bílkoviny poté tvoří 15 až 20 % sušiny [6].

Velké množství proteinů s molekulovou hmotností okolo 17 kDa je však vysráženo a odstraněno během vaření, zatímco většina volných aminokyselin v mladině je využita kvasinkami během fermentace [2, 6]. Některé typy bílkovin, obsažených v pivovarských surovinách, do piva vůbec nepřechází. Je to způsobeno jejich vlastní nerozpustností ve vodě a rovněž odolností k štěpné aktivitě enzymů. Mezi tyto látky patří např. gluteliny, které odcházejí z výroby s mlátem [6]. Z tohoto důvodu je většina obsažených proteinů ve formě peptidů a polypeptidů. Výjimku tvoří aminokyselina prolin, která nemůže být využita kvasinkami, a proto tvoří významnou část nízkomolekulárních sloučenin dusíku v pivě [2]. Dominantním faktorem způsobujícím ztrátu polypeptidů je chladové srážení a vznik chladového zákalu při chlazení mladiny na požadovanou zákvasnou teplotu po chmelovaru. Zákal je tvořen malými částicemi o průměru 0,5 µm, pomalu sedimentujícími, které obsahují přibližně 50 % bílkovin, 15 až 25 % polyfenolů a 20 až 30 % sacharidů [6].

Pivo obsahuje přibližně 500 mg/l bílkovinného materiálu, a to včetně polypeptidů s molekulovou hmotností menší než 5000 a větší než 100000. Tyto polypeptidy, které jsou původně ve většině případů z pšenice, jsou výsledkem proteolytických a chemických modifikací během vaření piva. S největší pravděpodobností mají také význam při tvorbě zákalu a tvorby pěny [2]. Významným faktorem těchto proteolytických a chemických

modifikací je změna sekundární struktury proteinu vlivem zvýšených teplot (denaturace, glykosylace, Maillardovy reakce), ke kterým dochází v průběhu sladování a varního procesu [6].

Hlavní společnou vlastností bílkovin piva je jejich stabilita v průběhu sladařského a pivovarského procesu a odolnost především k vyšším teplotám, extrémním hodnotám pH a proteolýze [6].

2.4.10.1 Protein Z

Protein Z představuje 10 – 25 % všech nedialyzovatelných bílkovin piva a je přibližně z jedné třetiny glykosylován. Jedná se o ječnou albuminovou bílkovinu o molekulové hmotnosti přibližně 40 kDa, je řazena mezi ječné serpiny (Serine Proteinase Inhibitors) a je tvořena několika homologními podjednotkami. Velice často bývá spojován se stabilitou pивní pěny. Jeho izoelektrický bod ($pI = 4,0 - 5,5$) se nachází blízko hodnotám pH piva.

Protein Z4 (BSZ4) je kódován jedním z mnoha genů na chromosomu 4 a je částečně homologní (asi ze 70 %) k proteinu Z7 (BSZ7), který je kódován na posledních dvou genech chromosomu 7. BSZ4 je dominantní formou a tvoří cca 80% proteinu. V zrně je přítomen ve třech formách – volné, vázané a skryté. Část vázané a skryté formy se transformuje během klíčení do formy volné, která snáze přechází do sladiny během rmutování. Interakcemi mezi serpiny a proteasami dochází k nedisociačnímu štěpení v reaktivní smyčce označované RSL, při kterém dojde k odštěpení přibližně 40 aminokyselin z karboxylového konce bílkoviny. Štěpení je doprovázeno konformačními změnami a formováním proteolyticky a tepelně stabilních forem proteinu Z. V ječmeni je BSZ7 v neštěpené formě, zatímco protein BSZ4 je už z významné části takto rozštěpen [6].

2.4.10.2 Lipid Transfer Protein 1

Lipid Transfer Protein (LTP1) je polypeptid o hmotnosti 9960 Da. Jedná se o albuminovou bílkovinu, u které byla prokázána schopnost inhibovat sladové cysteinové endoproteázy. Během procesu sladování je přeměňován v minimálním rozsahu. Mezi obsahem LTP1 v ječných zrnech a zeleném sladu nejsou významné rozdíly. K výrazným změnám nedochází ani během rmutování. Této stabilitě pravděpodobně napomáhají čtyři disulfidické můstky, které spojují čtyři α -helikální části této bílkoviny. Charakteristická je u této bílkoviny její téměř okamžitá extrakce při rmutování, a proto nezávislost na použité technologii sladování a rmutování. Ke změnám ve struktuře LTP1, tj. k oxidaci metioninového zbytku na metioninsulfoxid dochází během chmelovaru, kdy vzniká více modifikovaných forem LTP1. Tyto formy mají stejnou sekvenci aminokyselin, vykazují převážně lepší pěnотvorné vlastnosti a liší se v isoelektrickém bodě a v molekulové hmotnosti (9600 až 9900 Da). Během modifikací dochází k ireverzibilní denaturaci a ke změnám v imunoreaktivitě. LTP1 má schopnost spíše pěnu tvořit, než ji při vytvoření stabilizovat [6].

2.4.10.3 Bílkoviny vázající lipidy

V ječmeni a sladu se také nacházejí bílkoviny vázající lipidy (Lipid Binding Proteins – LBP), bílkoviny o hmotnosti přibližně 13 kDa. Jsou vázané na buněčné membrány a extrahovatelné detergenty. Jejich společnou vlastností je inhibice destabilizačních vlivů lipidů. Hlavní skupinou těchto proteinů jsou hordeindoliny (HIN) v ječmeni a puroindoliny (PIN) v pšenici. Jsou silně hydrofobní, a tudíž mají potenciálně pozitivní vliv na pěnu. Během rmutování jsou však hordeindoliny z podstatné části štěpeny proteolytickými enzymy na štěpy o nižší molekulové hmotnosti (podobně jsou štěpeny i puroindoliny) [6].

2.4.10.4 Hordeiny

Hordeiny jsou zásobní bílkoviny ječmene a skládají se z polymorfní směsi několika složek oddělitelných např. elektroforézou na polyakrylovém gelu. Základní skupiny jsou značeny B, C, D a γ a představují vysokomolekulární (>51 kDa), středněmolekulární (29 až 51 kDa) a nízkomolekulární (<29 kDa) látky. Významná skupina hordeinových derivátů má hmotnost nižší než 5 kDa. Jsou relativně bohaté na prolin a glutamin. V negativním smyslu se podílí na vzniku koloidních zákalů piva [6].

2.5 Hmotnostní spektrometrie

Analýza směsí přírodních látek, zejména jejich minoritních složek, vyskytujících se v potravinách vyžaduje vysoce selektivní a citlivé analytické metody, které jsou schopny identifikovat a kvantifikovat žádané sloučeniny a charakterizovat neznámé složky. Použití tradičních detektorů (např. UV-VIS) zanechává vždy určité procento nejistoty, zda měřené píky jsou píky aktuálně žádané sloučeniny nebo jiné, současně eluované složky. Právě problém s koelucí jiných sloučenin řeší hmotnostní spektrometrie, která umožňuje zjištění hmotnosti složek vzorku a současně i jejich identifikaci [15, 16].

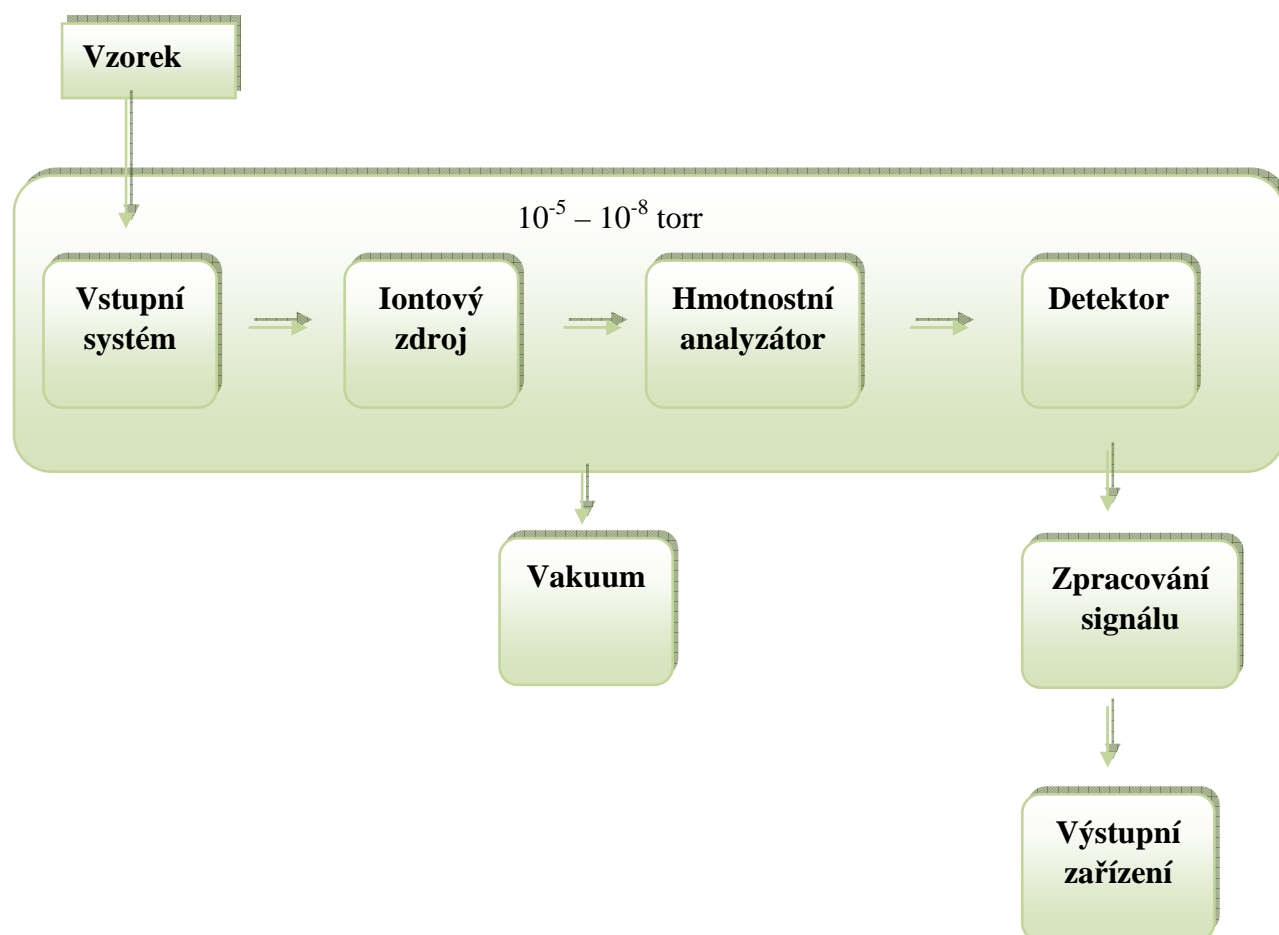
Hmotnostní spektrometrie (MS) je nejspíše nejvhodnější analytickou metodou při vědecké práci. Tím je míněno, že touto technikou lze získat informace jak o kvalitativním a kvantitativním složení anorganických a organických látek, tak o struktuře analyzovaných látek, informace o složení izotopů, složení a strukturu pevných povrchů aj. [17].

Hmotnostní spektrometrie je metoda založená na měření poměru hmotnosti k náboji (m/z) analyzovaných látek, resp. jejich iontů.

„Poměr hmotnosti k náboji“ je teda dán poměrem atomové popřípadě molekulové hmotnosti daného iontu jeho nábojem (náboji), které nese. Velmi často u iontů s nábojem +1, -1, je tento pojem často zkracován pouze na „hmotnost“. V přesném slova smyslu je tento pojem nesprávný, ale široce rozšířen a používán i v literatuře o hmotnostní spektrometrii [17].

Na obr. 2.7 je zobrazeno schéma hmotnostního spektrometru. Vstupní systém zajišťuje přívod vzorku do hmotnostního spektrometru, kde je převeden do formy iontů v plynné fázi. Velmi často je vstupní systém spjat se zařízením pro převedení pevných a kapalných vzorků do plynné fáze.

Iontový zdroj mění jednotlivé složky vzorku na ionty atakem elektronů, iontů, molekuly, nebo fotony. Další možností je také ionizace teplem nebo elektrickou energií. V mnoha případech je vstupní systém a iontový zdroj sloučen do jednoho zařízení. Vzniklé ionty jsou následně unášeny do hmotnostního analyzátoru, kde jsou separovány dle svých m/z .



Obr. 2.7 – Základní složení hmotnostních spektrometrů [17]

Po separaci jsou ionty zaznamenávány detektorem a vzniklý elektrický signál je dále zpracováván. Celý proces MS analýzy (s výjimkou vybraných ionizačních technik) probíhá za vysokého vakua (10^{-4} až 10^{-8} torrů) ve všech součástích přístroje kromě zařízení na zpracování signálu a výstupního zařízení [17], které brání vzájemným kolizím částic v plynné fázi [18].

Hmotnostní spektrometrie bývala vymezena pro stanovení pouze malých a termostabilních sloučenin a to zejména kvůli chybějící technice, umožňující jemnou ionizaci a převod ionizovaných molekul na plynnou fázi bez fragmentace molekuly.

Vzhled hmotnostních spekter pro dané molekuly je z velké části závislý na metodě ionizace [17]. Proces ionizace zásadně ovlivňuje citlivost metody a dosažitelnou mez detekce. Jestliže energie dodaná molekule v průběhu ionizace výrazně převyšuje její první ionizační energii, může dojít ke spotřebování nadbytečné vibračně-rotací energie a parentální ion se rozštěpí [19]. Některé ionizační techniky jsou mírné a produkují pouze ionizované molekuly analyzované látky (měkké ionizační techniky) a jiné jsou účinnější a produkují rovnou fragmenty molekul (tvrdé ionizační techniky) [19, 20].

Typickou tvrdou ionizační technikou může být označena ionizace elektrony. Tvrdé ionizační techniky udělují vzniklým iontům velkou energii, takže tyto ionty se nacházejí ve vysoce excitovaném stavu. Což dává následně velice kvalitní a komplexní spektra. Naproti tomu měkké ionizační techniky, jakými jsou například chemická ionizace či desorpce, dávají jednoduchá, málo fragmentovaná spektra. Obojí typy spekter jsou však velice užitečné. Jednoduchá spektra pocházející z měkkých ionizačních technik umožňují přímé stanovení

molekulové hmotnosti vzorku. Více komplexní spektra tvrdých ionizačních technik poté umožňují jednoznačnou identifikaci analytu [17].

2.5.1 Proteomika a hmotnostní spektrometrie

Před prudkým rozvojem proteomiky v devadesátých letech 20. století byly pro stanovení primární struktury proteinů používány zejména chemické nebo enzymatické metody. Polypeptidy tak musely být například sekvencovány postupně chemickou degradací od N konce k C konci s průběžnou identifikací postupně uvolňovaných aminokyselin pomocí LC-UV spektrometrie [21].

Rozvoj technik v průběhu 80. let 20. století, zejména uvedení šetrných ionizačních technik jako jsou ionizace elektrosprejem (ESI) a ionizace laserem za přítomnosti matrice (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization, MALDI), změnil dramaticky možnosti MS a umožnil stanovení vysokomolekulárních látek, jakými jsou například polypeptidy. [21, 22] Tento rozvoj také podmínil další rozvoj nových typů hmotnostních analyzátorů a víceúrovňových přístrojů (např. hybridní kvadrupól s průletovým analyzátozem (Q-Q-TOF) a tandemové uspořádání průletových analyzátorů (TOF-TOF).

2.5.2 Metody hmotnostní spektrometrie užívané při charakterizaci proteomu

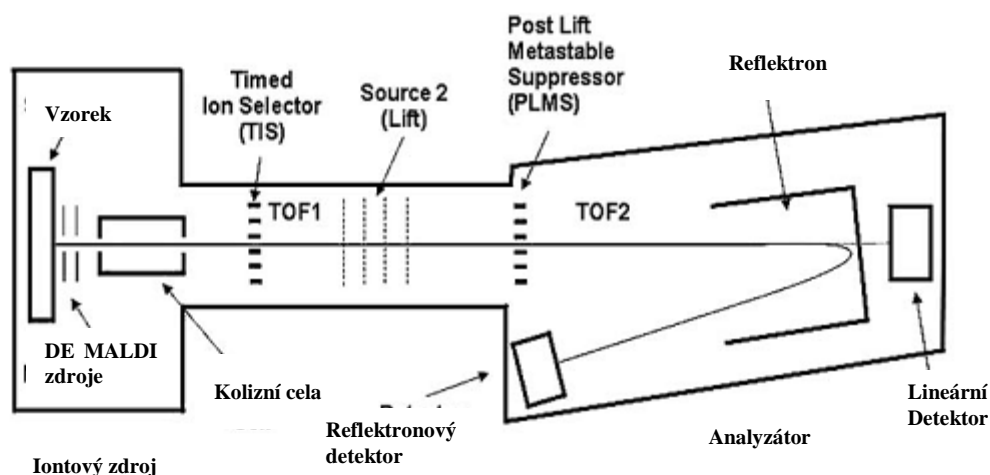
Při charakterizaci bílkovin (peptidů) je hmotnostní spektrometrie využívána jak pro jednoduché stanovení molekulové hmotnosti, zejména však pro jednoznačnou identifikaci proteinů. MS našla tak své uplatnění také při strukturní analýze, například při stanovení neznámých aminokyselinových sekvencí nebo určování posttranslačních modifikací a při kvantifikaci.

Vedle množství jiných typu přístrojů jsou pravděpodobně nejběžněji používanými kombinacemi ionizační techniky a hmotnostního analyzátoru v proteomice MALDI ionizace s průletovým analyzátozem (TOF) a ionizace ESI s iontovou pastí (IT) [21]. Techniky MALDI a ESI byly v roce 2002 oceněny Nobelovou cenou za chemii a mají nezastupitelný význam při analýze proteinů.

Při MALDI analýze dochází k ionizaci daného analytu pomocí laserového pulsu (obvykle 337 nm z pevného povrchu vzniklého krystalizací roztoku analytu s nadbytkem matrice. Účinkem laserového pulsu dojde k desorpci molekul matrice a analytu (peptidů resp. bílkovin) do plynné fáze a ionizaci analytu. Nadbytek matrice zamezuje nechtěné fragmentaci iontů. Vzniklé ionty nesou převážně jednotkový náboj a jsou urychlovány při průletu extrakční mřížkou mající dané napětí. Při použití ESI jako iontového zdroje zůstává vzorek v roztoku a prochází kapilárou udržovanou pod napětím, čímž dochází k ionizaci vzorku. Vzniklé kapičky vycházející z kapiláry procházejí do analyzátoru. Při přechodu dochází k postupnému odpařování rozpouštědla a vzniku vícenásobných iontů peptidů (bílkovin). Vzniklé ionty tak mohou nést jak jednotkový náboj, tak mohou být i vícenásobně nabitý [23].

V průletových analyzátozech dochází k separaci iontů dle jejich poměru m/z na základě jejich doby letu skrze trubici o přesně známé délce umístěné ve vakuu. Doba letu je zde poté přímo úměrná danému poměru m/z . Hlavní výhodou průletových analyzátorů je možnost detekce molekul s hmotností až 1 000 000 a zejména jeho vysoká citlivost. Vysokého rozlišení lze zde dosáhnout díky použitím iontových zrcadel (reflektronu) a zpožděné reakce, jehož základem je opožděná aplikace extrakčního napětí na mřížku oproti aplikaci laserového

pulsu (stovky nanosekund). Průletové analyzátoři mohou být užity při obou typech ionizaci – MALDI a ESI [23]. Poměrně novou je kombinace průletového analyzátoru s „LIFT“ technikou (MALDI LIFT-TOF/TOF MS). Tento hmotnostní spektrometr se skládá z MALDI iontového zdroje s následným zařízením pro zpožděnou reakci (DE, delayed extraction), časovým selektorem (TIS, timed ion selector), dále „lift“ zařízením pro zvýšení potenciální energie iontů, metastabilním supresorem (PLMS, post lift metastable suppressor), reflektorem a detektorem umožňujícím detekci v lineárním a reflektroновém uspořádání.

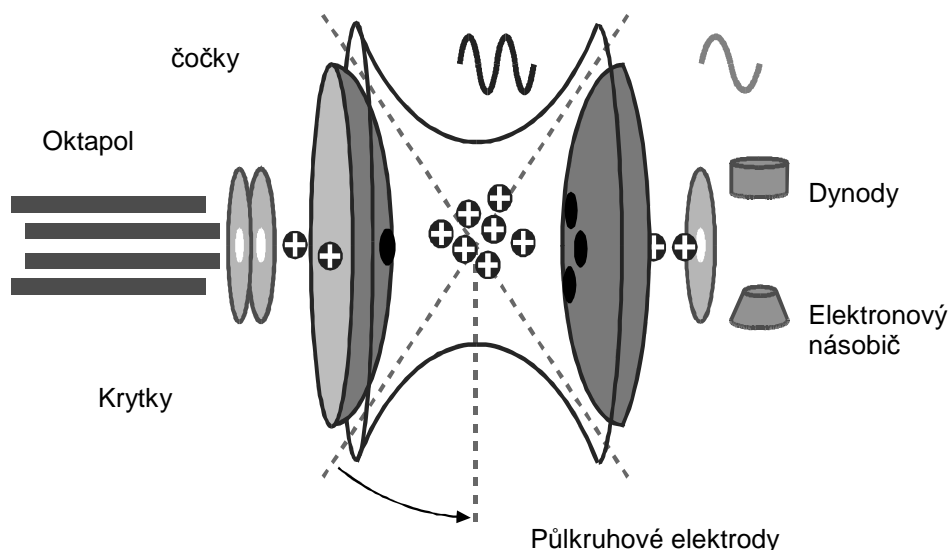


Obr. 2.8 – Schéma MALDI LIFT-TOF/TOF MS [24]

Ionty peptidů (bílkovin) vznikajících po aplikaci pulsu laserem vstupují do kolizní cely rychlostí, která je nepřímo úměrná hmotnosti daného peptidu (bílkoviny) a přímo úměrná akcelerujícímu vloženému napětí. Daný peptid (bílkovina) vstupuje do kolizní cely, kde dochází k jeho fragmentaci. Vzniklé fragmenty poté mají stejnou rychlost jako odpovídající peptid (bílkovina) ze které pocházejí a vstupují do oblasti TIS. Jelikož ionty peptidů (bílkovin) s odlišným m/z mají jinou rychlost (stejnou jako jejich vzniklé fragmenty), budou do oblasti TIS vstupovat postupně, podle příslušnosti k peptidu (bílkovině) ze které vznikly. Selektor zde plní funkci výběru požadovaného peptidu (bílkoviny) respektive jeho fragmentů. Ostatní skupiny fragmentů jsou vždy odkloněny, pouze v případě požadovaného fragmentu dojde k vypnutí odklápěcího napětí. Skupina fragmentů poté vstupuje do oblasti „LIFT“, skládajícího se ze tří částí. Zatímco při průchodu první a třetí částí dochází k akceleraci fragmentovaných peptidů, v druhé části dochází k jejich fokusaci. Fragmenty následně vstupují do oblasti PLMS, což je zařízení odpovídající si ve své podstatě TIS. Je nastaveno tak, aby došlo k odklonu metastabilních iontů, jejich následný rozklad by komplikoval výsledné spektrum [24].

Iontová past je představována zařízením, ve kterém jsou zachyceny anionty, či kationty, putující po určité trajektorii vlivem radiofrekvenčního pole (RF) [17]. Technologie iontové pasti je charakteristická schopností MS/MS analýz s vysokou senzitivitou a rychlým sběrem dat [21]. V praxi to pak vypadá tak, že ionty vstupují do iontové pasti a tam jsou zachycovány. Po naplnění iontové pasti určitým počtem iontů jsou ionty soustředěny do centra komůrky iontové pasti a změně napětí dochází k změně intenzity pole a destabilizaci drah iontů, které vycházejí z iontové pasti dle poměru m/z (skenování). Jednotlivé emitované ionty poté dopadají na detektor [17]. Při MS/MS analýze dochází k zachytu iontů uvnitř

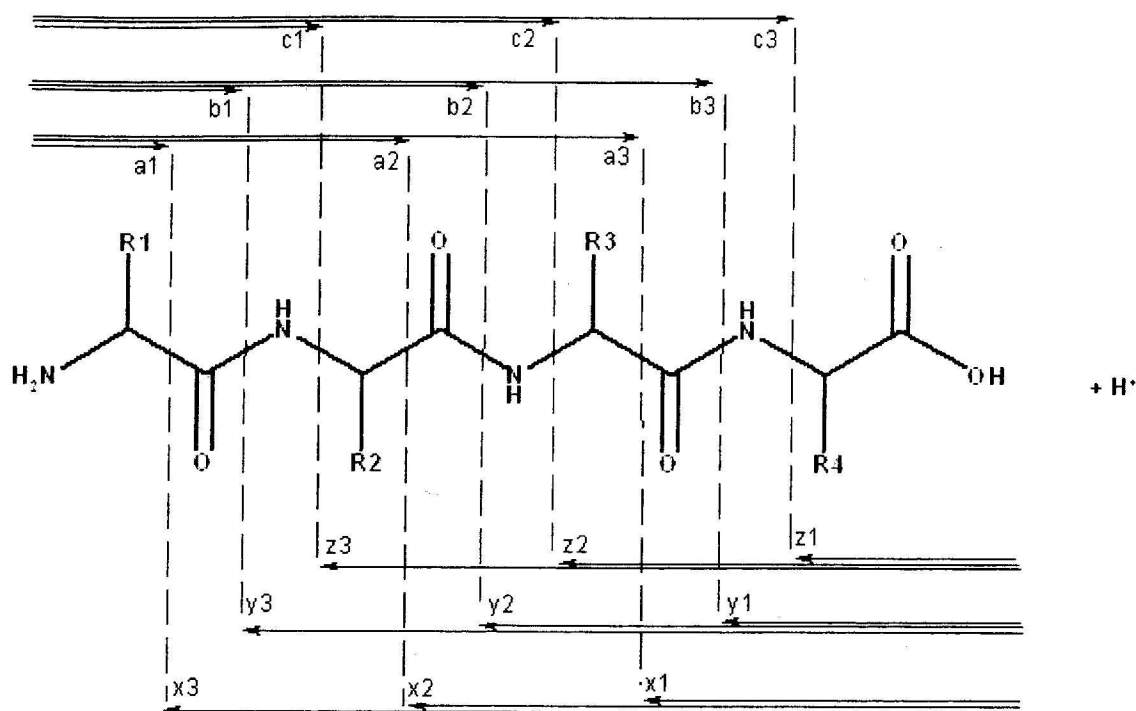
iontové past. Veškeré ionty, mimo požadovaného iontu (požadovaných iontů) o určitém m/z , jsou následně vypuzeny změnou intenzity RF. Požadovaný ion (požadované ionty) zachycený v iontové pasti je fragmentován vlivem kolize, fragmenty jsou pak emitovány na detektor dle svých m/z .



Obr 2.9 – Schéma iontové pasti

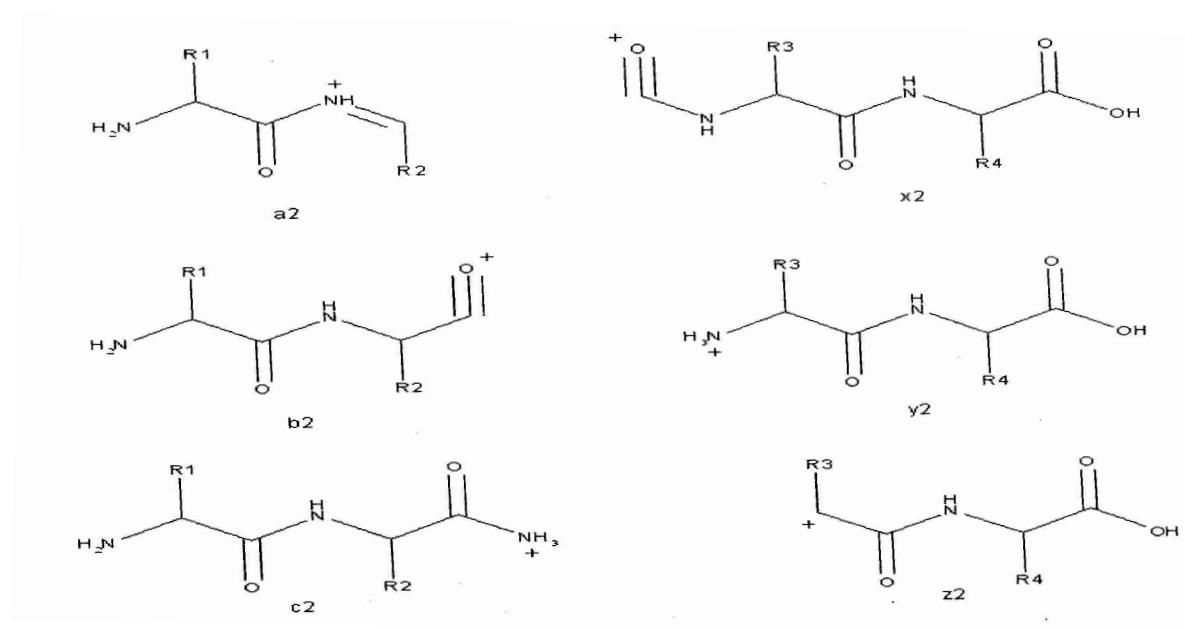
2.5.3 Metody identifikace a způsoby fragmentace peptidů

V současnosti jsou nejčastěji používány dvě základní metody identifikace proteinů hmotnostní spektrometrií. První je metoda peptidového mapování (peptide mass fingerprinting, peptide mapping), která je vhodná spíše pro jednotlivé bílkoviny. Bílkovina je nejprve proteolyticky naštěpena pomocí vhodné proteázy (nejčastěji trypsin) na peptidy a následnou MS analýzou jsou určeny jejich m/z resp. hmotnosti. Soubor hmotností peptidů (přesněji $[M+H]^+$) poté vytvářejí peptidovou mapu umožňující identifikaci stanovené bílkoviny porovnáním s teoretickými peptidovými mapami proteinů vytvořenými ze sekvencí uložených v databázi pomocí příslušného programu (např. Mascot). Druhá metoda identifikace proteinů je založena na zpracování MS/MS dat jednotlivých peptidů. Naštěpené peptidy jsou separovány obvykle kapalinovou chromatografií a v hmotnostním spektrometru následně fragmentovány. Vzniklé soubory fragmentů (fragmentační mapy) jsou pak databázovým prohledávacím programem srovnávány s teoretickými fragmentačními mapami vytvořenými z uložených proteinových sekvencí v databázi. Identifikace na základě MS/MS dat je vhodná i pro komplexní směsi proteinů bez jejich předchozí separace („shotgun proteomics“) [22].



Obr. 2.10 – typy fragmentací peptidů [25]

Nejčastějším způsobem „záměrné“ fragmentace je fragmentace vyvolána srážkami (CID – Collision Induced Dissociation). U peptidů jsou tímto způsobem převážně štěpeny jednotlivé peptidové vazby mezi aminokyselinami a takto vznikají série iontů lišících se o jednu aminokyselinu (obr. 2.10, 2.11) [26]. Užívané názvosloví pro ionty fragmentů je podle Beimannovy nomenklatury (1990). Při lokalizaci náboje na N-konci je iont klasifikován jako a, b nebo c. Při lokalizaci na C-konci je klasifikován jako x, y nebo z.. Při CID fragmentaci nejčastěji vznikají ionty typu b a y [25].



Obr. 2.11 – struktury fragmentů [25]

3 Experimentální část

3.1 Použité chemikálie, přístroje a materiál

3.1.1 Použité chemikálie

voda miliQ R = 18,2 mS
kyselina močová (Sigma-Aldrich)
kyselina thiomocová (Sigma-Aldrich)
3-((3-cholamidopropyl)dimethylamonium)-1-propansulfonát (CHAPS) (Sigma-Aldrich)
dithiotritol (Sigma-Aldrich)
Biolyte 3/10 Ampholyte (Bio-Rad)
Bromphenol Blue (Sigma-Aldrich)
iodacetamid (Sigma-Aldrich)
Tris Base (Serva)
dodecylsulfát sodný (Sigma-Aldrich)
glycerol (Sigma-Aldrich)
Akrylamis/bisakrylamid 30%T (Roth) (liquid)
amoniumpersulphate (Sigma-Aldrich)
TEMED (Sigma-Aldrich)
Precision Plus MW marker (Bio-Rad)
metanol (Lachner)
kyselina octová (Lachner)
Sypro-Ruby (Invitrogen)
acetonitril (Merck) (liquid)
trypsin, Sequencing Grade Modified Trypsin (Promega) (solid)
kyselina octová, pH = 4 (Promega)
uhličitan amonný (Sigma-Aldrich)
kyselina mravenčí (Sigma-Aldrich)
standardy peptidů s hmotnostním rozmezím 1000 – 3100 Da (Bruker Daltonik)

3.1.2 Přístroje

odsolovací kolona NAP-25, Sephadex G-25 (GE Health care)
ReadyStrip IPG strip pH 3 – 10NL, 17 cm (Bio-Rad)
zařízení na fokusaci – Protean IEF Cell (Bio-Rad)
sestava pro 2-D elektroforézu (Bio-Rad)
- Protean II xi Cell (Bio-Rad)
- PowerPac 3000
termomixér (Eppendorf)
vakuová koncentrátor Savant
centrifuga (Eppendorf)
hmotnostní spektrometr Ultraflex III (Bruker Daltonik, Brémy, Německo)

sestava LC-MS/MS

- gradientová pumpa (Ultimate, LC Packings)
- automatický dávkovač (Famos, LC Packings)
- přepínací modul (Switchos, LC Packings, Amsterdam, Nizozemí)
- HCTultra PTM Discovery System hmotnostní spektrometr (Bruker Daltonik)

3.1.3 Software

PDQuest 8.0.1 (Bio-Rad)

Flex Analysis 3.0 (Bruker Daltonik)

MS Biotoools 3.1 (Bruker Daltonik)

DataAnalysis 4.0 (Bruker Daltonik).

MASCOT 2.2 (MatrixScience, Londýn, UK).

3.1.4 Vzorky

K analýze bílkovin hmotnostní spektrometrií byly použity 4 druhy láhvého piva různých značek.

Gambrinus

Typ piva:	světlé výčepní
Typ kvašení:	spodní
Obsah alkoholu:	4,1 %
Výrobce:	Plzeňský Prazdroj a.s. v Plzni
Výroba:	pivovar Plzeň

Primus

Typ piva:	světlé výčepní
Typ kvašení:	spodní
Obsah alkoholu:	4,2 %
Výrobce:	Plzeňský Prazdroj a.s. v Plzni
Výroba:	pivovar Protivín

Pilsner Urquell

Typ piva:	světlý ležák
Typ kvašení:	spodní
Obsah alkoholu:	4,4 %
Výrobce:	Plzeňský Prazdroj a.s. v Plzni
Výroba:	pivovar Plzeň

Heineken

Typ piva:	světlý ležák
Typ kvašení:	spodní
Obsah alkoholu:	5,0 %
Výrobce:	Heineken International, Nizozemí
Výroba:	pivovar Zoeterwoude, Nizozemí

3.2 Příprava vzorků

Vlastní přípravu jednotlivých vzorků je možno rozdělit do několika hlavních kroků a to na odplynění, odsolení, 2D gelovou elektroforézu a in-gel digesti.

3.2.1 Úprava vzorků

Okamžitě po otevření bylo 200 ml vzorku piva převedeno do odsávací baňky a odplyněno připojením odsávací baňky na vakuum po dobu 10-ti minut. Vzorek zbavený zejména oxidu uhličitého byl následně použit k extrakci.

3.2.2 Odsolení

Odsolení bylo provedeno aplikací 2,5 ml odplyněného vzorku na odsolovací kolonku (NAP-25) a vysokomolekulární frakce byla eluována 3,5 ml miliQ vody. Poté byla kolonka regenerována 200 ml miliQ vody a po vymytí nízkomolekulární frakce byl aplikován další vzorek. Celkem tak bylo získáno 7 ml vzorku, který byl následně vysušen ve vakuovém koncentrátoru.

3.2.3 2D gelová elektroforéza

Vysušené vzorky byly rozpuštěny v IPG fokusačním pufru (7M urea, 2M thiourea, 2% CHAPS, 60 mM DTT, 0,8% ampholyte, 0,003% BPB) a naneseny na strip (17 cm, pH 3 – 10). Vzorek byl nanesen pasivní hydratací při 24 °C po dobu 12-ti hodin. Následně byla provedena izoelektrická fokusace pomocí přístroje Protean IEF Cell. Izoelektrická fokusace probíhala v několika stupních dle nastaveného napětí (150 V po dobu 30-ti minut, 1500 V po dobu 3 hodin, 3500 V po dobu 3 hodin, 5000 V do 80000 VH a 500 V udržovací krok). Proteiny byly rozseparovány podle svého izoelektrického bodu pI.

Před nanesením stripu na gel byla provedena redukce vzorku s následnou alkylací. Redukce probíhala v prostředí 2% DTT po dobu 10-ti minut. Následná alkylace byla provedena 2,5% iodacetamidem (IAA) po dobu 10-ti minut.

Následně byly bílkoviny rozděleny podle relativní molekulové hmotnosti (Mr). Tento druhý rozměr separace byl proveden na přístroji Protean II xi Cell vložení stripu na 12%T vertikální polyakrylamidový gel s následnou elektroforézou při konstantním napětí 30 mA na 1 gel (20 x 20 cm) po dobu asi 4,5 hodiny při 10 °C. Na gel byly aplikovány také MW markery – standardy, obsahující deset rekombinantních proteinů o hmotnosti 10 kD, 15 kD, 20 kD, 25 kD, 37 kD, 50 kD, 75 kD, 100 kD, 150 kD a 250 kD.

Před barvením byla provedena fixace proteinů v gelu pomocí 10% metanolu a 7% kyseliny octové po dobu 30-ti minut. Gel byl následně obarven barvivem Sypro Ruby. Barvení probíhalo ve tmě po dobu 3 – 12 hodin. Po ukončení barvení byl gel opětovně promyt roztokem metanolu a kyseliny octové a naskenován.

Vyhodnocení 2D gelů bylo provedeno programem PDQuest Basic v. 8.0.1, pomocí kterého byly vybrány vhodné spoty pro následnou identifikaci pomocí hmotnostní spektrometrie. Vybrané vzorky spotů byly vyříznuty a uchovány s 50 µl miliQ vody.

3.2.4 In-gel digesce

Připravené vzorky byly umístěny na termomixér po dobu 10-ti minut při 20 °C. Následně byla odstraněna veškerá voda a přidáno opět 100 µl miliQ vody. Vzorky byly opět umístěny na termomixér po dobu 10-ti minut při 20 °C.

Byly připraveny vzorky uhličitanu amonného o koncentracích 50 a 25 mM. Současně byl připraven také roztok 50 mM uhličitanu amonného s acetonitrilem v poměru 1:1.

U vzorků s gelem byla odstraněna veškerá voda a bylo přidáno 50 µl 50 mM pufru uhličitanu amonného s acetonitrilem. Vzorky byly umístěny na termomixér po dobu 15-ti minut při 20 °C. Po uplynutí doby byla veškerá kapalina odsáta a bylo přidáno 25 µl acetonitrilu. Takto připravené vzorky byly opět umístěny na termomixér po dobu 5-ti minut při 20 °C.

Po vysušení byl acetonitril odsát a bylo přidáno 20 µl 50 mM uhličitanu amonného. Eppendorfovy zkumavky se vzorky a pufrem byly umístěny za stálého chlazení do ultrazvukové lázně při 0 °C. Po 5-ti minutách bylo do zkumavky přidáno 20 µl acetonitrilu a ponecháno dalších 5 minut v ultrazvukové lázni. Následně byl roztok acetonitrilu a pufru odsát a bylo přidáno 20 µl acetonitrilu. Takto připravené zkumavky byly opět umístěny do ultrazvukové lázně za stálého chlazení při teplotě 0 °C po dobu 5-ti minut. Po uplynutí doby byl veškerý acetonitril odsát a vzorky gelu byly vysušeny ve vakuovém koncentrátoru.

Po vysušení byl ke vzorkům přidán 25 µl roztoku trypsinu v uhličitanu amonném o výsledné koncentraci 5ng/µl. Připravené vzorky byly inkubovány po dobu 45-ti minut při teplotě 4 °C. Po ukončení inkubace byly vzorky umístěny na 2 hodiny do termomixéru při 40 °C.

3.3 MS analýza

3.3.1 MS detekce

Vzorky připravené podle postupu uvedeného v kap. 2.3 byly podrobeny detekci na hmotnostních spektrometrech. Pro analýzu byly použity dva typy hmotnostních spektrometrů. Prvním byl hmotnostní spektrometr MALDI-TOF/TOF (Bruker Daltonik, Brémy, Německo), druhým byl hmotnostní spektrometr s iontovou pastí spojený s kapalinovým chromatografem (LC-MS/MS) (Bruker Daltonik, Brémy, Německo). Peptidy byly extrahovány z gelu použitím 50% roztoku acetonitrilu a 5% kyseliny mravenčí.

MALDI-MS a MS/MS analýzy byly provedeny pomocí hmotnostního spektrometru Ultraflex III (Bruker Daltonik, Brémy, Německo). Přístroj při sběru MS dat (peptidové mapy) pracoval v refletronovém modu s detekcí pozitivních iontů. Následně bylo vybráno z každého vzorku až dvanáct dominantních píků nacházejících se v hmotnostním rozmezí 700 – 3600 Da s minimální hodnotou S/N 10 k MS/MS analýze. Jednotlivé vzorky (1 µl) byly naneseny na vzorkovací destičku s hydrofilními „kotvami“ AnchorChip a následně překryta roztokem matrice (1 µl) a před vlastní MS analýzou byly ponechány při laboratorní teplotě k úplnému zaschnutí. Jako matrice byla použita CHCA připravená podle Havliša (Havlis et al., 2003). Produkty autoproteolýzy trypsinu byly použity k interní kalibraci digestovaných peptidů. V případě absence těchto produktů, byla použita metoda externí kalibrace, využívající směs sedmi standardů peptidů (Bruker Daltonik) s hmotnostním rozmezím

1000 – 3100 Da. Vyhodnocení dat bylo následně provedeno pomocí programů Flex Analysis 3.0 a MS Biotoools 3.1 (Bruker Daltonik).

LC-MS/MS analýzy byly provedeny za pomoci LC-MS/MS systému, skládajícího se z gradientové pumpy (Ultimate), automatického dávkovače (Famos), přepínacího modulu (Switchos, LC Packings, Amsterdam, Nizozemí), a hmotnostního spektrometru s iontovou pastí vybaveného elektrosprejem (HCTultra PTM Discovery System, Bruker Daltonik). Po nástřiku (15 µl) byly vzorky nejprve zkoncentrovány a odsoleny pomocí předkolony (PepMap C18, 300 µm x 5 mm, LC Packings). Po promytí 0,1% kyselinou mravenčí (FA) byly peptidy eluovány gradientem roztoku acetonitrilu v 0,1% FA (4 µl/min) na analytickou kolonu (320 µm x 180 mm), na které došlo k separaci proteinů. Kolona byla naplněna sorbent Jupiter Proteo (4 µm, 90 Å, Phenomenex, Torrance, CA) podle již dříve popsané metody (Planeta et al., 2003). Mobilní fáze A obsahovala směs acetonitril/0,1% FA (5/95 v/v) a mobilní fáze B obsahovala směs acetonitril/FA (80/20 v/v). Gradientová eluce začínala na 5 % mobilní fáze B a po čtyřech minutách došlo k lineárnímu vzrůstu z 5 % na 50 % během 55-ti minut. Výstup z kolony byl propojen s elektrosprejem pomocí křemenné kapiláry o vnitřním průměru 50 µm. Jako sušící a zmlžovací plyn byl použit dusík. Tlak dusíku byl 15 psi. Teplota a průtok sušícího plynu byly nastaveny na 300 °C a 6 L/min a napětí na kapiláře bylo nastaveno na 4 kV. Hmotnostní spektrometr pracoval v pozitivním módu v rozsahu m/z 300 – 1500 pro sběr MS dat a 100 – 3000 pro sběr MS/MS dat. Zpracování a úprava dat pro databázové prohledávání bylo provedeno pomocí softwaru DataAnalysis 4.0 (Bruker Daltonik).

3.3.2 Zpracování dat

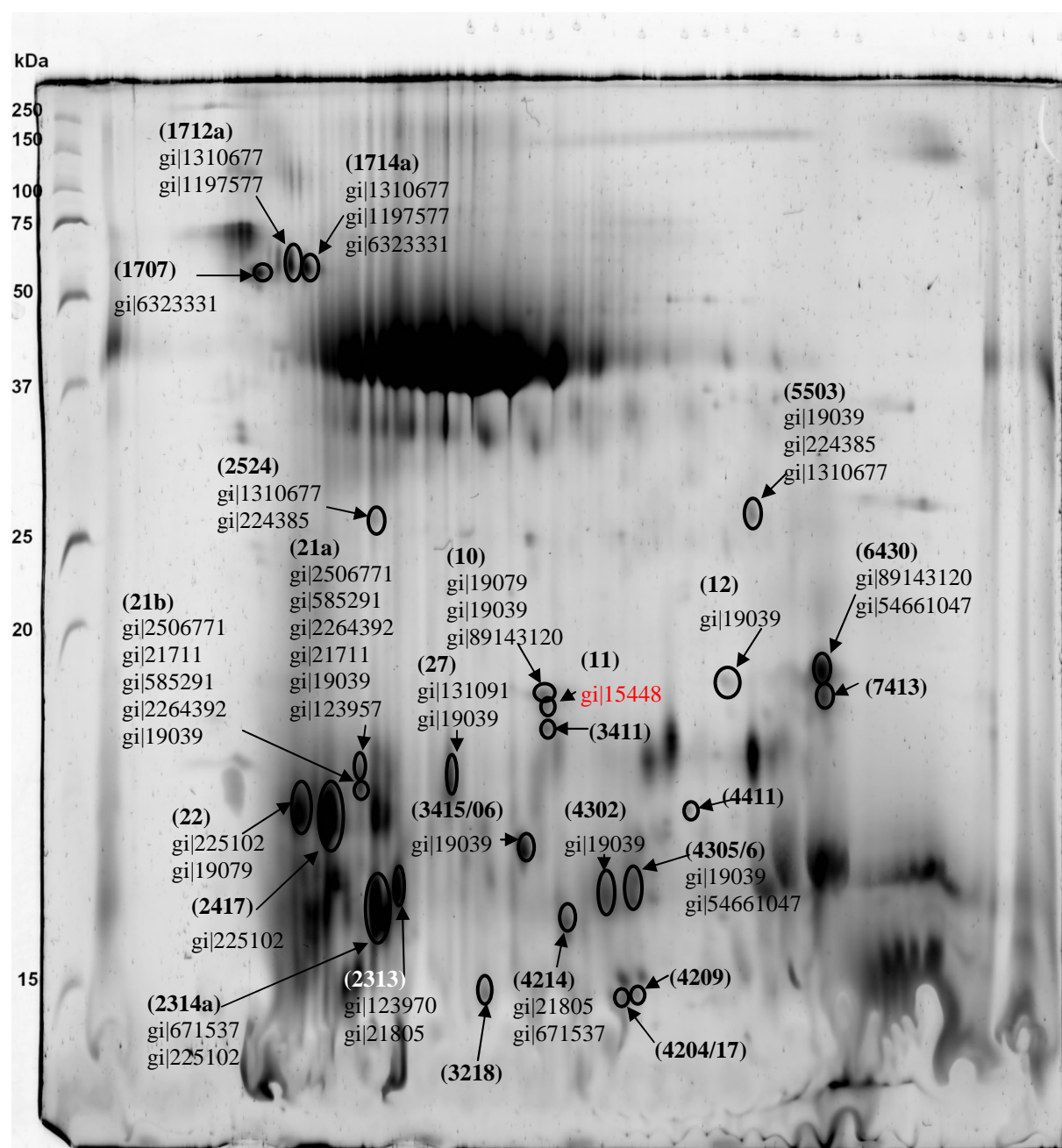
Pro zpracování MS a MS/MS dat byl použit vyhledávací program MASCOT 2.2 (MatrixScience, Londýn, UK). K databázovému vyhledávání byla použita NCBI proteinová databáze (verze 20090210). Povolená hmotnostní tolerance byla pro MALDI-MS data pro peptidové mapování 30 ppm a pro MS/MS data 0,6 Da. Pro LC-MS/MS data byla hmotnostní tolerance peptidů a MS/MS fragmentů pro MS/MS zvolena shodně 0,5 Da. Veškeré vyhledávání bylo provedeno bez taxonomických omezení. Volitelnou modifikací byla oxidace metioninu a karbamidometylace cysteinu.

4 Výsledky

Uvedený postup byl použit ke srovnání bílkovinného složení piv čtyř různých značek. K analýze byla použita tři česká piva (Gambrinus, Primus, Pilsner Urquell) a jedno zahraniční (Heineken). Po separaci proteinových izolátů dvourozměrnou gelovou elektroforézou byly gely srovnány pomocí analýzy obrazu a na základě tohoto srovnání byly vybrané spoty podrobeny MS analýze. Souhrn identifikovaných proteinů i s informací v kterých vzorcích byl odpovídající spot nalezen je uveden v Tab. 4.1. U obrázků jednotlivých gelů jsou vyznačeny spoty, které byly v daném gelu analyzovány včetně databázových kódů (NCBI) identifikovaných proteinů, černě jsou bílkoviny rostlinného původu, červeně bílkoviny pocházející z kvasinek, bakterií nebo plísni.

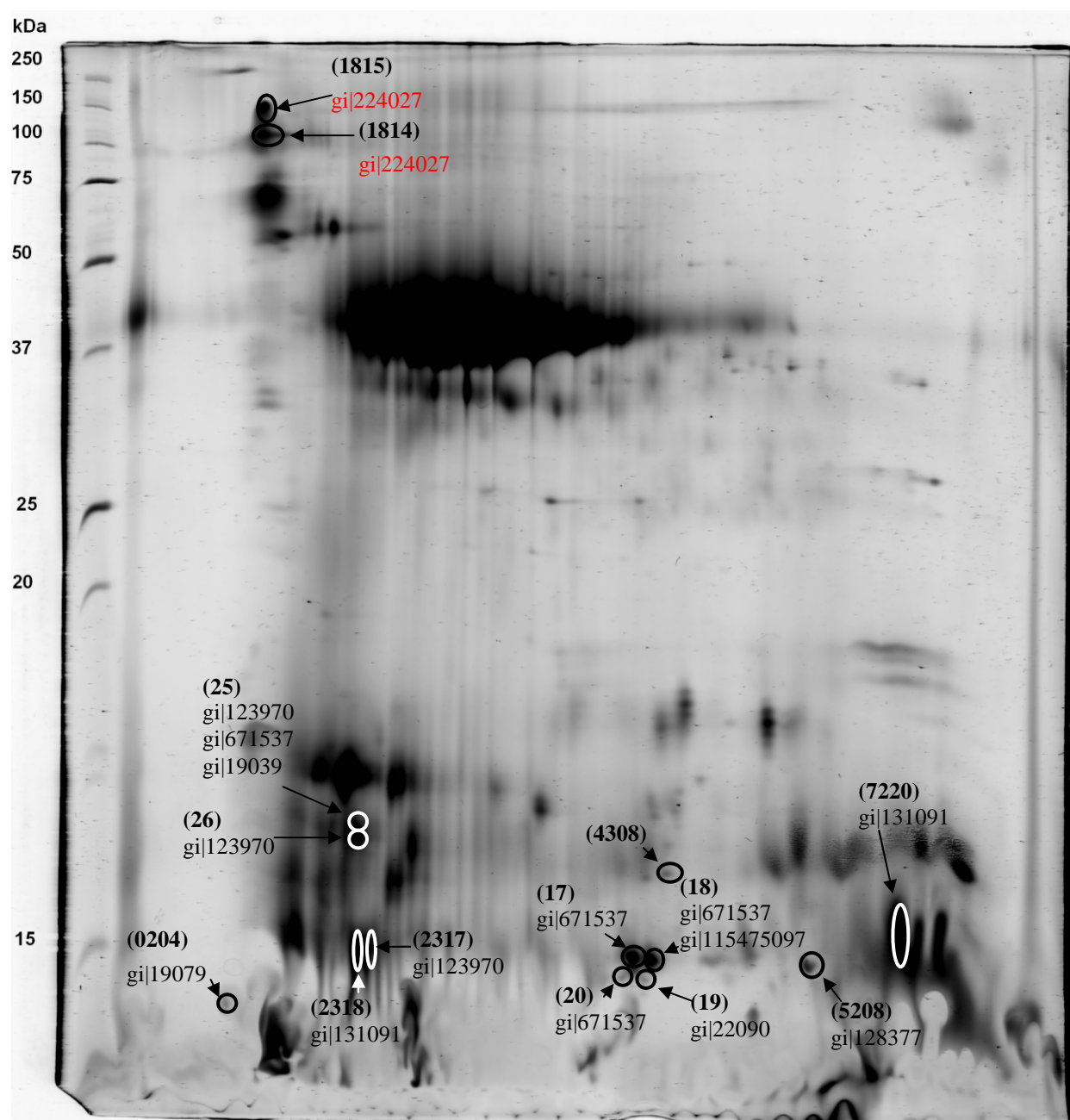
Tabulky obsahující dodatečné informace o daných spotech, včetně metody jakou byla bílkovina identifikována, jsou uvedeny v příloze (Tab. 9.2 – 9.5).

4.1 Výsledky proteomické analýzy ve vzorku piva Gambrinus



Obr. 4.1 – Gambrinus

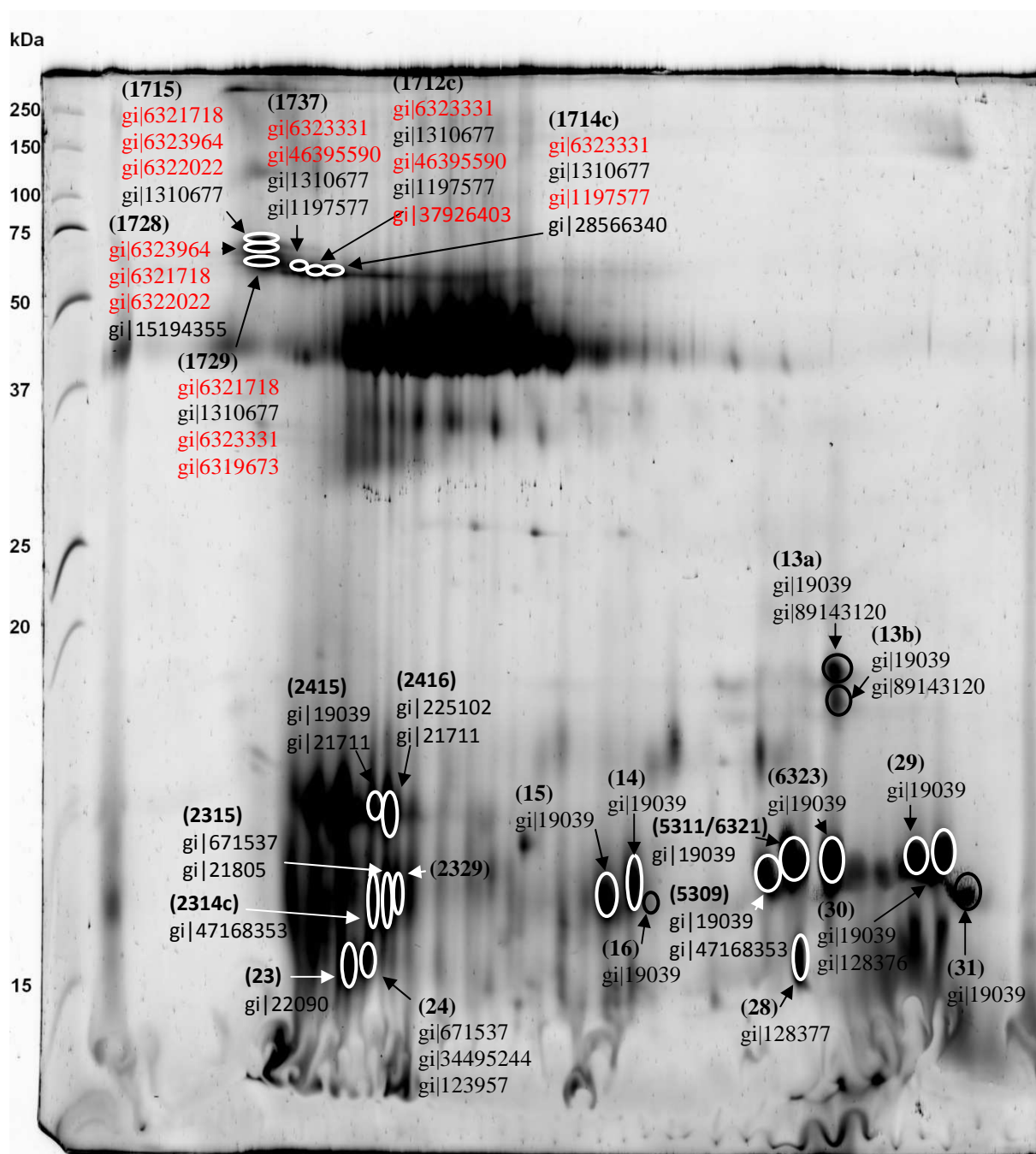
4.2 Výsledky proteomické analýzy ve vzorku piva Primus



Obr. 4.2 – Primus

Spoty číslo 20 a 19, odpovídající spotům 4204/17 a 4209 z piva Gambrinus, které se nepodařilo identifikovat, zde byly identifikovány jako hordeinové složky.

4.3 Výsledky proteomické analýzy ve vzorku piva Pilsner Urquell

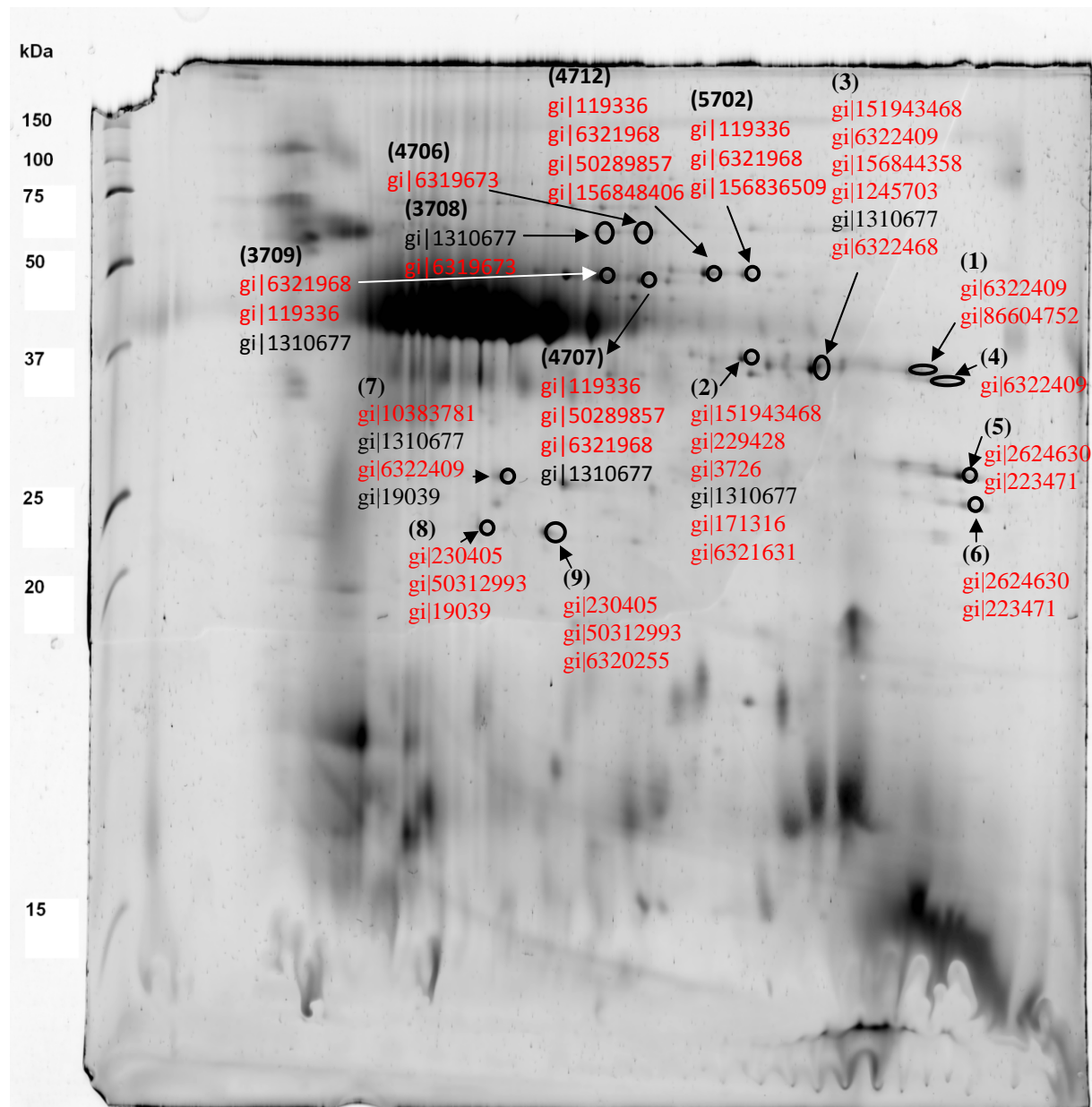


Obr. 4.3 – Pilsner Urquell

Enzym exo-1,3-beta-glukanáza identifikovaný ve spotu 1707 ve vzorku piva Gambrinus byl identifikován i v odpovídajícím spotu 1729 piva Pilsner Urquell. V odpovídajících si spotech 1712a, 1714a (Gambrinus) a 1712c, 1714c (Pilsner Urquell) byla identifikována bílkovina serpin. Ve spotech 1714a a 1714c byl navíc také současně identifikován enzym exo-1,3-beta-glukanáza. Spoty 24 (Pilsner Urquell) a jemu odpovídající spot 2317 (Primus) obsahovaly alfa-amylázový inhibitor. V odpovídajících si spotech 2415, 15 a 14 (Pilsner Urquell) a 21b, 4302 a 4305/6 (Gambrinus) byl identifikován LTP (lipid transfer protein). Ve spotu 28 (Pilsner Urquell) a jemu odpovídajícímu spotu 5208 (Primus) poté LTP prekurzor.

Bílkoviny 16 a 13b pocházející z piva Pilsner Urquell a jím odpovídající spoty 4308 (Primus) a 7413 (Gambrinus) nemohly být mezi sebou porovnány, jelikož ve spotech 4308 a 7413 nedošlo k identifikaci bílkovin pocházejících z piva.

4.4 Výsledky proteomické analýzy ve vzorku piva Heineken



Obr. 4.4 – Heineken

U identifikovaných spotů ze vzorku piva Heineken je zřejmá převaha bílkovin pocházejících z kvasinek (*Saccharomyces cerevisiae*). Z bílkovin rostlinného původu jsou zde zastoupeny zejména protein Z a LTP.

V tabulce 4.1 byly identifikované spoty pocházející z reálných gelů rozděleny na serpiny a protein Z, trypsin/ α -amylázové inhibitory, bílkoviny z kvasinek, LTP, hordeiny a ostatní bílkoviny. Číslo spotu u bílkoviny znamená pozitivní identifikaci dané bílkoviny ve spotu (odpovídajících spotech). Číslo spotu v závorce znamená, že ve spotu (dané značky piva)

nebyla bílkovina identifikována, přestože jeho pozice odpovídá spotu, ve kterém tato bílkovina byla identifikována u jiné značky piva. Znak „+“ znamená odpovídající spot v dané značce piva, který nebyl podroben identifikaci. Hodnota „---“ znamená, že odpovídající spot v dané značce piva nebyl po podrobení image analýzou nalezen. Názvy proteinů identifikovaných u jednotlivých vzorků jsou v Tab. 4.1 uvedeny v angličtině přesně v tom tvaru, v němž byly převzaty z databáze, aby nedošlo k nepřesnostem.

Vyhodnocení naskenovaných gelů bylo provedeno pomocí programu PDQuest Basic. Zpracováním byl vytvořen *in silico* master gel (Obr. 9.1), na kterém jsou vyobrazeny spoty ze všech gelů a je základem pro kvalitativní vyhodnocení reálných gelů a výběr spotů k následné MS analýze. Z celkového počtu 80 analyzovaných spotů byl protein identifikován v 68 spotech.

Tab. 4.1 – seznam identifikovaných proteinů

název proteinu/popis organismus	Accession No.	Teor. pI	Teor. Mr (Da)	Gambrinus	Primus	Urquell	Pilsner	Heineken
Serpiny a protein Z								
Serpin	gi 1197577	5,5	42794	1712a	+	1712c	+	
<i>Hordeum vulgare</i>				1714a	+	1714c	+	
<i>subsp. vulgare</i>				+	+	1737	+	
Protein z-type serpin	gi 1310677	5,6	43193	1712a	+	1712c	+	
<i>Hordeum vulgare</i>				1714a	+	1714c	+	
<i>subsp. vulgare</i>				+	+	1715	+	
				(1707)	+	1729	+	
				+	+	1737	+	
				+	+	---	2	
				+	+	+	3	
				+	+	+	7	
				2524	---	---	---	
				5503	+	---	+	
				+	+	+	3708	
				+	+	+	3709	
				+	+	+	4707	
Protein Z	gi 131091	5,7	43249	27	+	+	+	
<i>Hordeum vulgare</i>				+	2318	(23)	+	
				+	7220	+	---	
Protein Z	gi 19079	5,3	19910	10	+	---	+	
<i>Hordeum vulgare</i>				22	+	+	+	
				+	0204	+	---	

Tab. 4.1 – pokračování

název proteinu/popis organismus	Accession No.	Teor. pI	Teor. Mr (Da)	Gambrinus	Primus	Urquell	Pilsner	Heineken
Trypsin/ α-amylázové inhibitory								
Alpha-amylase/trypsin inhibitor	gi 123957	7,4	18209	21a	+	+	---	---
<i>Triticum aestivum</i>				+	2317	24	+	+
				2313	+	+	+	+
				+	25	---	+	+
				+	26	2314c	---	---
Trypsin/amylase inhibitor	gi 225102	5,3	14737	22	+	+	+	+
<i>Hordeum vulgare</i>				2417	+	+	+	+
<i>subsp. vulgare</i>				2314a	+	(2315)	+	+
				+	+	2416	+	+
CMd3 protein	gi 2264392	8,0	18458	21a	+	+	---	---
<i>Hordeum vulgare</i>				21b	+	(2415)	+	+
Alpha-amylase inhibitor	gi 2506771	5,4	15805	21a	+	+	---	---
<i>Hordeum vulgare</i>				21b	+	(2415)	+	+
Alpha-amylase/trypsin inhibitor	gi 585291	6,1	18513	21a	+	+	---	---
<i>Hordeum vulgare</i>				21b	+	(2415)	+	+
CM 17 protein precursor	gi 21711	5,1	15979	21a	+	+	---	---
<i>Triticum aestivum</i>				21b	+	2415	+	+
				+	+	2416	+	+
HMW glutenin subunit	gi 22090	8,6	75656	(4209)	19	+	---	---
<i>Triticum aestivum</i>				+	(2318)	23	+	+
Putative avenin-like a precursor	gi 89143120	8,4	18415	10	+	---	+	+
<i>Triticum aestivum</i>				6430	+	13a	+	+
				(7413)	+	13b	+	+

Tab. 4.1 – pokračování

název proteinu/popis organismus	Accession No.	Teor. pI	Teor. Mr (Da)	Gambrinus	Primus	Pilsner Urquell	Heineken
Bílkoviny pocházející z kvasinek							
Glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase <i>Kluyveromyces marxianus</i>	gi 1245703	6,4	35386	+	+	+	3
Glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	gi 15194346 8	6,3	35711	+	+	+	3
				+	+	---	2
Glyceraldehydephosph ate dehydrogenase <i>Saccharomyces</i>	gi 229428	9,2	35524	+	+	---	2
3-phosphoglycerate kinase <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	gi 10383781	7,1	44711	+	+	+	7
Mutase, phosphoglycerate <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	gi 223471	9,1	26900	+	+	---	5
				--	+	---	6
Soluble cell wall protein <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	gi 15194355 1	4,7	40149	---	---	1728	---
Hypothetical protein <i>Bifidobacterium adolescentis L2-32</i>	gi 15448712 2	6,0	70707	11	+	---	+
Hypothetical protein Kpol_1060p40 <i>Vanderwaltozyma polyspora</i>	gi 15684435 8	6,2	35885	+	+	+	3
Coproporphyrinogen oxidase <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	gi 171316		37674	+	+	---	2

Tab. 4.1 – pokračování

název proteinu/popis organismus	Accession No.	Teor. pI	Teor. Mr (Da)	Gambrinus	Primus	Urquell	Pilsner	Heineken
Enolase 1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	gi 119336	6,2	46773	+	+	--		4712
Chain A Triosephosphate Isomerase <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	gi 230405	5,8	26648	+	---	+		8
				+	+	+		9
Chain A Phosphoglycerate Mutase <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	gi 2624630	8,9	27461	+	+	---		5
				---	+	---		6
Unnamed protein product <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	gi 3726	8,8	35662	+	+	---		2
Chain A <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	gi 37926403	4,5	46935	(1712a)	+	1712c		+
Glucan 1,3-beta-glucosidase precursor <i>Saccharomyces bayanus</i>	gi 46395590	4,4	51196	1712 a	+	1712c		+
				+	+	1737		+
Unnamed protein product <i>Kluyveromyces lactis</i>	gi 50312993	5,8	27978	+	---	+		8
				+	+	+		9
Glycolytic enzyme phosphoglucose isomerase <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	gi 6319673	6,0	61261	+	+	1729		+
Triose phosphate isomerase <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	gi 6320255	5,7	26779	+	+	+		9

Tab. 4.1 – pokračování

název proteinu/popis organismus	Accession No.	Teor. pI	Teor. Mr (Da)	Gambrinus	Primus	Urquell	Pilsner	Heineken
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	gi 6321631	6,5	35724	+	+	---		2
Cell wall protein with similarity to glucanases <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	gi 6321718	4,7	40148	+	+	1715		+
				---	---	1728		---
				1707	+	1729		+
Enolase II <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	gi 6321968	5,7	46885	+	+	+		3709
Putative protein of unknown function <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	gi 6322022	4,4	99676	+	+	1715		+
				---	---	1728		---
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	gi 6322409	8,3	35728	+	+	---		1
				+	+	+		3
				+	+	---		4
				+	+	+		7
Exo-1,3-beta-glucanase <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	gi 6323331	4,6	51279	1707	+	1729		+
				1714a	+	1714c		+
				(1712a)	+	1712c		+
				+	+	1737		+
Cell wall protein with similarity to glucanases <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	gi 6323964	4,5	40445	+	+	1715		+
				---	---	1728		---
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase <i>Synechococcus sp.</i>	gi 86604752	6,5	36691	+	+	---		1

Tab. 4.1 – pokračování

název proteinu/popis organismus	Accession No.	Teor. pI	Teor. Mr (Da)	Gambrinus	Primus	Pilsner Urquell	Heineken
Lipid transfer protein							
Non-specific lipid- transfer protein 1 precursor <i>Hordeum vulgare</i>	gi 128376	8,7	12293	+	+	30	+
Probable non-specific Lipid-transfer protein precursor <i>Hordeum vulgare</i>	gi 128377	6,8	10350	5208	+	28	+
LTP 1 <i>Hordeum vulgare</i>	gi 19039	8,9	14198	+	+	5309	+
				+	+	6323	+
				10	+	---	+
				12	---	+	+
				21a	+	+	---
				21b	+	2415	+
				27	+	+	+
				5503	+	---	+
				3415/06	+	+	+
				4302	+	15	+
				4305/6	+	14	+
				+	25	---	+
				(6430)	+	13a	+
				(7413)	+	13b	+
				+	+	29	+
				+	+	30	+
				+	+	31	---
				+	+	+	7
				+	---	+	8

Tab. 4.1 – pokračování

název proteinu/popis organismus	Accession No.	Teor. pI	Teor. Mr (Da)	Gambrinus	Primus	Urquell	Pilsner	Heineken
Hordeiny								
Hordein B	gi 224385	7,7	30384	2524	---	---	---	---
<i>Hordeum vulgare</i>								
<i>subsp. vulgare</i>				5503	+	---		+
Hordoinoline-b1	gi 54661047	8,5	16112	6430	+	(13a)		+
<i>Hordeum vulgare</i>								
<i>subsp. vulgare</i>				4305/6	+	(14)		+
				2314a	+	2315		+
				4214	---	+		+
				+	17	+		+
				+	18	+		+
				(4204/17)	20	+		---
				+	25	---		+
				+	(2317)	24		+
Ostatní bílkoviny								
Heat shock protein	gi 21805	6,2	16857	2313	+	+		+
<i>Triticum aestivum</i>				4214	---	+		+
Glucoamylase G1	gi 224027	4,2	65448	---	1815	---		---
<i>Aspergillus niger</i>				+	1814	+		+
Os08g0184600	gi 11547509	12,2	17088	+	18	+		+
<i>Oryza sativa</i>	7							
Ovalbumin	gi 28566340	5,2	42877	(1714a)	+	1714c		+
<i>Gallus gallus</i>								
Globulin-like protein	gi 34495244	6,8	52034	+	(2317)	24		+
<i>Oryza sativa</i>								
Ovalbumin	gi 45384056	5,2	42884	(1714 a)	+	1714c		+
<i>Gallus gallus</i>								
N/R				7413, 3411, 3218, 4411, 4204/17, 4209, 4308, 2314 c, 2329, 5311/6321, 4706, 5702				

5 Diskuse

Analýza proteomu poskytla přehled bílkovin, které lze zvoleným způsobem detekovat ve zkoumaných vzorcích piva. V předložené práci bylo nalezeno 80 signifikantních spotů pocházejících z 2-D elektroforézy u čtyř druhů piv. Konkrétně bylo nalezeno 27 spotů pocházejících ze vzorku piva Gambrinus, 13 spotů pocházejících ze vzorku piva Primus, 24 spotů pocházejících ze vzorku piva Pilsner Urquell a 16 spotů ze vzorku piva Heineken.

K identifikaci bílkovin piva byl použit dnes již standardní postup využívající techniku hmotnostní spektrometrie po předchozí separaci proteinů pomocí dvourozměrné gelové elektroforézy. Pro zpracování MS a MS/MS dat byl použit vyhledávací program MASCOT 2.2 (MatrixScience, Londýn, UK). K databázovému vyhledávání bylo využito NCBI proteinové databáze (verze 20090210).

Z celkového počtu analyzovaných spotů se nepodařilo identifikovat žádný protein ve 12 spotech. Neúspěšná identifikace mohla být způsobena několika faktory. Například proteinové databáze neobsahují kompletní sadu proteinů ječmene (není zveřejněn celý genom ječmene), za druhé, příliš nízká koncentrace proteinů v daných spotech, a nebo proteiny neobsahovaly dostatečný počet štěpných míst pro použitou proteázu – trypsin, případně štěpná místa byla i přes denaturaci proteinu nedostupná pro proteolytické štěpení. (Trypsin přednostně štěpí peptidový řetězec na karboxylovém konci aminokyselin lysinu a argininu, s výjimkou případů, kdy je následován aminokyselinou prolinem).

Identifikované proteiny lze rozdělit do několika skupin (viz. tab. 4.1). První skupina je tvořena serpiny, zejména proteinem Z, který byl identifikován v několika spotech a je majoritní složkou proteinových izolátů. Protein Z náleží do rodiny serpinů a může být dále rozdělen na protein Z4 a Z7. Biochemická role serpinů zůstává nejasná. Serpiny mohou poskytovat ochranu proti hmyzím predátorům, některé serpiny jsou hlavní složkou albuminu ječného endospermu, mohou také zastávat roli zásobních proteinů. Protein Z obsahuje několik podjednotek s kyselým pI, které jsou glykosylovány během procesu sladování nejčastěji vlivem Maillardových reakcí. Některé práce dokonce uvádějí, že až 16 % lysinů obsažených v proteinu Z je glykosylováno. Protein Z přispívá k stabilitě pěny piva a tvorbě zákalu [27]. Protein Z resp. jeho části, se podařilo identifikovat ve všech vzorcích piva a to v hmotnostním rozpětí 19 – 43 kDa a rozsahu pI 5 – 6.

Další skupinou jsou α -amylázové/trypsin inhibitory. Bývají často také uváděny jako chloroform/metanol (CM) rozpustné proteiny a to díky jejich možné extrahovatelnosti ve směsi těchto organických rozpouštědel. Inhibiční aktivita tohoto proteinu není pravděpodobně zaměřena přímo proti enzymům ječmene, ale proti enzymům hmyzu a jiných patogenům. Předpokládá se, že jeho hlavní role je ochrana škrobových zrn při napadení hmyzem nebo dalšími savčími predátory [27]. Skupina α -amyláz/trypsin inhibitorů byla identifikována v rozsahu pI 5 – 8 a hmotnostním rozsahu 15 – 19 kDa.

Skupina bílkovin pocházejících z kvasinek je zastoupen zejména enzymem glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenázou. Jedná se o enzym katalyzující šestý krok glykolýzy, čímž přispívá k odbourání glukózy za zisku energie. Kromě toho bylo v současné době zjištěno, že je také spřažen s dalšími nemetabolickými procesy, jako jsou aktivace transkripce či iniciace apoptózy [28]. Dalšími identifikovanými bílkovinami byly také enzymy patřící do skupiny mutáz či oxygenáz.

Další významnou bílkovinou identifikovanou ve vzorcích piva je LTP. In vivo funkce ječného LTP není známá. Původně bylo uvažováno, že se jedná o inhibitor α -amylázy nebo proteáz. V dnešní době se předpokládá, že hlavní role LTP je v ochraně rostliny před mikrobiálními patogeny a při ochraně hydrofóbní kutikulární vrstvy obalující rostlinné orgány. Po uvaření piva je ječný LTP1 obsažen zejména v pivní pěně, kde přispívá při tvorbě a stabilitě pěny [27]. Identifikované spoty LTP se pohybovaly v rozsahu pI 7 – 9 a hmotnostním rozsahu 10 – 14 kDa.

Významnými identifikovanými spoty byly B a D hordeiny. Hordeiny jsou řazeny mezi prolaminy, hlavní skupinu obilných zásobních proteinů nacházejících se v zrně. Tyto proteiny ječného endospermu jsou většinou charakterizovány nízkou rozpustností ve vodě. Obsahují velké množství prolinu a glutaminu. Hordeinové frakce nacházející se v pivě iniciují tvorbu zákalu [27].

Ječná zrna, stejně jako chmel či kvasinky použité při výrobě piva obsahují velkou škálu skupin bílkovin, z nichž pouze malá část přejde při procesu výroby piva do finálního výrobku. Hlavní společnou vlastností bílkovin piva je jejich stabilita v průběhu sladařského a pivovarského procesu a odolnost především k vyšším teplotám, extrémním hodnotám pH a proteolýze. Tyto bílkoviny zde poté mají nezastupitelný význam, zejména pak při tvorbě pěny a zákalu, popřípadě také konečné chuti piva, kdy dovářejí pocit plnosti, a kvality piva [29]. Konečné složení bílkovin je závislé na vstupních surovinách, resp. na použité technologii a takto lze využít proteomické analýzy k identifikaci původu piva a ke stanovení jeho jakosti.

6 Závěry

Předložená práce byla zaměřena na charakterizaci a identifikaci bílkovin obsažených ve zkoumaných vzorcích piva, přehled o současném stavu analýzy proteomu piva a přehled instrumentálních metod vhodných k jejich stanovení.

V teoretické části byla pozornost věnována postupu výroby piva, zejména však komplexnímu složení piva se zaměřením na peptidy a bílkoviny. Součástí je také přehled metod používaných ke kvalitativnímu a kvantitativnímu stanovení bílkovin. Zvláštní kapitola je poté věnována hmotnostní spektrometrii.

V experimentální části byl analyzován bílkovinný obsah u čtyř různých značek piva a výsledky byly porovnány mezi sebou. Analyzovanými pivy byly piva značek Gambrinus, Primus, Pilsner Urquell a Heineken. Po odsolení byl každý vzorek podroben 2-D elektroforéze. Následně proběhl výběr signifikantních spotů a jejich identifikace pomocí LC-MS tandemové techniky využívající ionizaci elektrosprejem a iontovou past jako analyzátor. Druhou metodou byla identifikace na hmotnostním spektrometru MALDI-TOF. Pro zpracování MS a MS/MS dat byl použit vyhledávací program MASCOT 2.2 (MatrixScience, Londýn, UK). Databázové vyhledávání bylo provedeno pomocí NCBI proteinové databáze (20080502 nebo novější).

Identifikované bílkoviny byly rozděleny do 6-ti skupin, podle rodin do kterých náleží nebo původu, na serpiny a protein Z, trypsin/ α -amylázové inhibitory, bílkoviny pocházející z kvasinek, LTP, hordeiny a ostatní bílkoviny, do kterých byly zahrnuty také spoty bez signifikantních výsledků. Výsledky analýzy jsou uvedeny v tabulce 4.1.

Kvalitativní složení jednotlivých značek piva nevykazovalo signifikantní rozdíly, pouze v pivu značky Heineken převládaly proteiny z kvasinek. Jednotlivé skupiny bílkovin, zejména jejich zastoupení a poměr, však mají nepostradatelný význam v komplexním sensorickém hodnocení charakteru piva.

7 Seznam použitých zdrojů a literatury

1. **Koukal, Milan.** Metabolický syndrom se bojí piva! *Metabolický syndrom se bojí piva!* [Online] 21. století.cz, 19. říjen 2007. [Citace: 21. leden 2009.] <http://www.21století.cz/view.php?cislocclanku=2007101902>.
2. **Cortacero-Ramírez, Sonia, a další.** Analysis of beer components by capillary electrophoretic methods. *Trends in Analytical Chemistry*. 2003, Sv. 22, stránky 440-455. Dostupný online : www.sciencedirect.com.
3. Tradiční technologie výroby piva. [Online] 2008. [Citace: 22. 11 2008.] <http://www.sci.muni.cz/mikrob/kvasbiotech/pivo/tradpiv.html>.
4. Chmel - O pivu . [Online] 2004. [Citace: 22. 11 2008.]
5. **Lea, A.G.H. a Piggott, J.R.** *Fermented beverage production*. London : Chpman & Hall, 1995. str. 413. ISBN 0 7514 0027 0.
6. **Čížková, Hana, a další.** Význam bílkovin z hlediska pěnivost a stability pěny. *Chemické listy*. 2006, Sv. 100, stránky 478-485. Dostupný online : www.sciencedirect.com.
7. **Jackson, Michael.** Encyklopedie piva. Praha : Volvox Globator, 1988, Sv. 1, str. 22.
8. Typy a druhy českého piva. [Online] 2004. [Citace: 22. 11 2008.]
9. **Drdák, M., a další.** *Základy potravinářských technologií*. Bratislava : Malé centrum, 1996. 80-967064-1-1.
10. **Jackson, Michael.** Encyklopedie piva. Praha : Volvox Globator, 1988, Sv. 1, str. 9.
11. **MZe.** Ministerstvo zemědělství České republiky. [Online] 2008. [Citace: 22. 11 2008.] <http://www.mze.cz/Index.aspx?ch=270&typ=1&val=41684&ids=0>.
12. Carbohydrates - Chemical Structure. [Online] 2005. [Citace: 7. březen 2009.] <http://www.scientificpsychic.com/fitness/carbohydrates1.html>.
13. Isoascorbic acid. [Online] 2008. [Citace: 26. 11 2008.] <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=6981>.
14. **Mišovie, Z.** *Sledovanie zmien obsahu sírnych látok v pive a surovinách*. Brno : Vysoké učení technické v Brně; Fakulta chemická, 2007.
15. **Štulík, K.** *Analytické separační metody*. Praha : Nakladatelství Karolinum, 2004.
16. **Careri, M., Bianchi, F. a Corradini, C.** Recent advances in application of mass spectrometry in food-related analysis. *Journal of Chromatography*. 2002, Sv. 970, 3-64.
17. **Skoog, Douglas A. a Leary, James J.** *Principles of instrumental analysis*. Orlando, Florida : Harcourt Brace & Company, 1992. 0-03-023343-7.
18. **Klouda, Pavel.** *Moderní analytické metody*. Ostrava : Pavel Klouda, 2003. str. 132. 80-86369-07-2.
19. **Trčková, M.** *Využití metody LC/MS k analýze vybraných přírodních fyziologicky aktivních látek*. Brno : Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2008.
20. **Abian, J.** The coupling of gas and liquid chromatography with mass spectrometry. *Journal of mass spectrometry*. 1999, Sv. 34, 157-168.
21. **Domon, Bruno a Aebersold, Ruedi.** Mass Spectrometry and protein analysis. *Science*. 2006, Sv. 312, 212-217.
22. **Zdráhal, Z. a Fajkus, J.** Hmotnostní spektrometrie a proteomika. *Klin. Biochem. Metab.* 2007, Sv. 3, 132-137.
23. **Hernandez, Patricia, Müller, Markus a Appel, Ron D.** Automated protein identification by tandem mass spectrometry: issues and strategies. *Mass Spectrometry Reviews*. 2006, Sv. 25, 235-254.

24. **Suckau, Detlev, a další.** A novel MALDI LIFT-TOF/TOF mass spectrometer for proteomics. *Anal. Bioanal. Chem.* 2003, Sv. 376, 952-965.
25. **GmbH, Bruker Daltonik.** *BioTools User manual, Version 3.1.* Německo : Bruker Daltonics.
26. **James, Peter.** *Proteome Research: Mass Spectrometry - principles and practice.* Berlin, Germany : Springer-Verlag, 2001. 3540672559.
27. **Perrocheau, Ludivine, et al.** Probing heat-stable water-soluble proteins from barley to malt and beer. *Proteomics.* 2005, Vol. 5, 2849-2858.
28. **Tarze, A, a další.** GAPDH, a novel regulator of the pro-apoptotic mitochondrial membrane permeabilization. *Oncogene.* 26, 2007, 2606-2620.
29. **Silva, Filipe, et al.** Electrophoretic and HPLC methods for comparative study of the protein fractions of malts, worts and beers produced from Scarlett and Prestige barley (*Hordeum vulgare* L.) varieties. *Food Chemistry.* 2008, Vol. 106, 820-829.

8 Seznam použitých zkratk a symbolů

amu	- atomová hmotnostní jednotka
APS	- amonumpersulfát
BCA	- bicichoninic acid
BPB	- bromfenolová modř
CM	- chloroform-metanol
DMS	- dimetylsulfid
DTT	- dithiotritol
EPM	- extrakt původní mladiny
ESA	- elektrostatický analyzátor
ESI	- ionizace elektrosprejem
HGB	- High Gravity Brewing (mladina o vysoké hustotě)
HPLC	- vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IAA	- iodacetoamid
IEF	- izoelektrická fokusace
IT	- iontová past
kD	- kilodalton
LBP	- lipid binding proteins
LC-MS	- kapalinová chromatografie – hmotnostní spektrometrie
LGB	- nízkohustotní mladina
LOX-less	- lipoxygenase-1-less variants
LTP	- lipid transfer proteins
m/z	- poměr hmotnosti k náboji
MALDI	- ionizace laserem za účasti matrice
mM	- milimol
mS	- milisiemens
Mr	- relativní molekulová hmotnost
MS	- hmotnostní spektrometrie
MS/MS	- tandemová hmotnostní spektrometrie
MW	- relativní molekulová hmotnost; hmotnostní
PTM	- posttranslační modifikace
S/N	- poměr šum k pozadí
SDS	- dodecylsulfát sodný
TOF	- time of flight analyzátor
UV-VIS	- ultrafialové – viditelné světlo
VH	- volthodina

9 Seznam příloh

1. Obr. 9.1 – Master gel
2. Tab. 9.1 – Intenzity jednotlivých spotů u jednotlivých značek pív
3. Tab. 9.2 – Seznam nalezených proteinů ve vzorku piva Gambrinus
4. Tab. 9.3 – Seznam nalezených proteinů ve vzorku piva Primus
5. Tab. 9.4 – Seznam nalezených proteinů ve vzorku piva Pilsner Urquell
6. Tab. 9.5 – Seznam nalezených proteinů ve vzorku piva Heineken

[illegible]

page 1 of 1

- 58 -

Tab. 9.1 – Intenzity jednotlivých spotů u jednotlivých značek pív

Zpracováním byl vytvořen „in silico“ master gel (Obr. 9.1) na kterém jsou vyobrazeny spoty ze všech gelů a je základem pro kvalitativní vyhodnocení reálných gelů a výběr spotů k následné MS analýze. Tabulka odpovídajících spotů v jednotlivých reálných gelech stejně jako intenzita těchto spotů je zobrazena v Tab. 9.1. Hodnota „0“ znamená, že v daném gelu nebyl spot nalezen. Hodnota „N“ znamená, že daný spot v master gelu nebyl v daném gelu piva podroben identifikaci.

sorted by:pI	Quantitation Table					
SSP	Mr	pI	Gambrinus	Primus	Pilsner Urquell	Heineken
0107	14	3.6	516.0	38912.1	28227.0	0
Spot č.			N	0204	N	N
1805	121	3.9	25426.8	323400.4	57457.3	23622.0
Spot č.			N	1814	N	N
1807	163	4.0	0	78734.1	0	0
Spot č.			N	1815	N	N
1705	70	4.1	182838.8	351304.0	99225.8	155020.7
Spot č.			N	N	1715	N
1711	60	4.1	0	0	68490.9	0
Spot č.			N	N	1728	N
1706	56	4.1	62723.5	179836.2	106844.1	48283.5
Spot č.			1707	N	1729	N
2701	59	4.2	28969.9	80349.0	76078.5	312962.0
Spot č.			N	N	1737	N
2704	57	4.4	42810.3	84893.4	47626.2	25452.5
Spot č.			1712a	N	1712c	N
2403	17	4.4	264562.8	56473.5	141024.3	180618.2
Spot č.			22	N	N	N
2707	58	4.5	78198.1	35923.4	65568.2	74767.2
Spot č.			1714a	N	1714c	N
2405	17	4.6	292979.0	615925.3	74375.0	298248.3
Spot č.			2417	N	N	N
2310	16	4.8	37408.2	197600.8	0	91940.8
Spot č.			N	25	N	N
2212	14	4.8	168218.6	174736.7	55729.2	74746.4
Spot č.			N	2318	23	N
2305	15	4.8	80977.8	19778.1	208246.0	0
Spot č.			N	26	2314c	N
2214	15.16	4.9	94131.1	181550.2	413034.9	75463.1
Spot č.			N	2317	24	N
2416	18	4.9	7386.3	11588.8	25246.0	0
Spot č.			21a	N	N	N
2407	17	4.9	25447.0	2449.4	63661.4	8584.9
Spot č.			21b	N	2415	N

Tab. 9.1 - pokračování

SSP	Mr	pI	Gambrinus	Primus	Pilsner Urquell	Heineken
3208	16	4.9	79299.5	0	117687.1	117237.5
Spot č.			N	N	2329	N
3501	26	4.9	34664.5	0	0	0
Spot č.			2524	N	N	N
3401	17	4.9	159970.5	137980.8	98822.2	84601.0
Spot č.			N	N	2416	N
3301	15	5.0	285115.9	166031.3	117976.7	163921.9
Spot č.			2314a	N	2315	N
3302	16	5.1	134497.2	154459.2	159509.6	440968.2
Spot č.			2313	N	N	N
3408	22	5.5	4136.9	0	2619.2	13304.0
Spot č.			N	N	N	8
3406	18	5.5	48771.2	6635.7	21715.1	94794.0
Spot č.			27	N	N	N
3509	26	5.7	9098.5	17426.0	29283.4	23204.8
Spot č.			N	N	N	7
4201	15	5.8	53958.3	49889.8	35842.5	11878.3
Spot č.			3218	N	N	N
4409	21	5.9	5925.5	7196.7	12318.4	28688.8
Spot č.			N	N	N	9
4304	16	6.1	118493.9	130023.9	67665.6	63861.6
Spot č.			3415/06	N	N	N
4404	18	6.2	53532.2	9549.1	0	9803.2
Spot č.			10	N	N	N
4405	18	6.2	16877.4	8864.0	0	3812.5
Spot č.			3411	N	N	N
4406	19	6.2	45540.5	4715.6	0	4775.0
Spot č.			11	N	N	N
4704	60	6.3	7761.7	6016.9	7732.7	10007.1
Spot č.			N	N	N	3708
4610	49	6.4	13876.1	11829.9	9279.7	31667.8
Spot č.			N	N	N	3709
4305	16	6.4	76210.4	N	63269.6	22261.2
Spot č.			4214	N	N	N
4702	61	6.7	3082.5	5340.6	21572.5	9468.3
Spot č.			N	N	N	4706
4701	48	6.7	14112.5	15693.3	13851.5	13895.2
Spot č.			N	N	N	4707
4306	16	6.7	92606.6	28760.5	214119.4	227664.8
Spot č.			4302	N	15	N
4213	15	6.7	23916.9	18486.1	36607.0	0
Spot č.			4204/17	20	N	N

Tab. 9.1 - pokračování

SSP	Mr	pI	Gambrinus	Primus	Pilsner Urquell	Heineken
5201	15	6.8	39746.2	164981.5	29892.6	44976.7
Spot č.			N	17	N	N
5301	16	6.9	50913.6	34144.5	212403.8	73603.3
Spot č.			4305/6	N	14	N
5211	14	6.9	22463.2	17977.8	22935.6	0
Spot č.			4209	19	N	N
5204	15	6.9	41947.8	128815.8	53186.9	16618.7
Spot č.			N	18	N	N
5304	16	7.0	31314.4	28968.1	52360.2	0
Spot č.			N	4308	16	N
5701	49	7.2	6779.8	5712.5	0	18115.3
Spot č.			N	N	N	4712
5604	37	7.4	5107.1	15480.5	0	25910.5
Spot č.			N	N	N	2
5702	49	7.4	6900.5	4853.5	0	15091.8
Spot č.			N	N	N	5702
5407	19	7.6	26970.0	0	32755.1	16813.6
Spot č.			12	N	N	N
5501	27	7.8	20325.2	5122.6	0	9438.9
Spot č.			5503	N	N	N
5307	16	7.9	175156.1	92804.7	182215.3	312867.6
Spot č.			N	N	5309	N
5607	36	7.9	7904.1	18149.5	12292.7	61791.7
Spot č.			N	N	N	3
5309	16	8.0	178073.9	48041.0	150258.3	307578.4
Spot č.			N	N	5311/6321	N
6201	15	8.1	27026.1	50297.3	109663.1	0
Spot č.			N	5208	28	N
6403	19	8.3	267746.6	86590.1	142230.3	357575.2
Spot č.			6430	N	13a	N
6404	19	8.3	76043.7	33338.6	109119.7	112983.9
Spot č.			7413	N	13b	N
6304	17	8.3	479470.9	8334.2	157129.8	543281.2
Spot č.			N	N	6323	N
7211	15	8.8	14980.7	535307.2	33479.1	0
Spot č.			N	7220	N	N
6602	35	8.8	13137.9	14979.8	0	80403.8
Spot č.			N	N	N	1
6311	16	8.9	127419.0	66258.2	197596.3	1272.5
Spot č.			N	N	29	N
6601	35	8.9	13557.2	16839.9	0	20337.7
Spot č.			N	N	N	4

Tab. 9.1 - pokračování

SSP	Mr	pI	Gambrinus	Primus	Pilsner Urquell	Heineken
6503	27	9.0	36765.7	27079.0	0	69216.6
Spot č.			N	N	N	5
7405	24	9.1	0	2598.8	0	20149.5
Spot č.			N	N	N	6
7301	16	9.0	123629.8	28877.8	162817.3	25209.1
Spot č.			N	N	30	N
7302	16	9.2	63485.4	105242.9	90293.8	0
Spot č.			N	N	31	N

Tab. 9.2 – Seznam nalezených proteinů ve vzorku piva Gambrinus

Spot	název proteinu/popis	organismus	Accession No.	Teor. pI	Teor. Mr (Da)	Poz. pI	Poz. Mr (kDa)	metoda identifikace	Proteiny odpovídající stejné sérii peptidů
10	Protein Z	<i>Hordeum vulgare</i>	gi 19079	5,3	19910	6,2	18	LCMSMS	gi 224339; gi 131091; gi 1310677
10	LTP 1	<i>Hordeum vulgare</i>	gi 19039	8,9	14198	6,2	18	LCMSMS	gi 128376; gi 47168353; gi 157830246
10	Putative avenin-like a precursor	<i>Triticum aestivum</i>	gi 89143120	8,4	18415	6,2	18	LCMSMS MALDIMSMS	
11	Hypothetical protein	<i>Bifidobacterium adolescentis L2-32</i>	gi 154487122	6,0	70707	6,2	18	LCMSMS	
12	LTP 1	<i>Hordeum vulgare</i>	gi 19039	8,9	14198	7,6	19	LCMSMS	gi 128376; gi 47168353; gi 157830246
21 a	Alpha-amylase inhibitor	<i>Hordeum vulgare</i>	gi 2506771	5,4	15805	4,9	18	LCMSMS	
21 a	Alpha-amylase/trypsin inhibitor	<i>Hordeum vulgare</i>	gi 585291	6,1	18513	4,9	18	LCMSMS	gi 758343
21 a	CMd3 protein	<i>Hordeum vulgare</i>	gi 2264392	8,0	18458	4,9	18	LCMSMS	gi 2266660
21 a	CM 17 protein precursor	<i>Triticum aestivum</i>	gi 21711	5,1	15979	4,9	18	LCMSMS	

Tab. 9.2 – pokračování

Spot	název proteinu/popis	organismus	Accession No.	Teor. pI	Teor. Mr (Da)	Poz. pI	Poz. Mr (kDa)	metoda identifikace	Proteiny odpovídající stejné sérii peptidů
21 a	LTP 1	<i>Hordeum vulgare</i>	gi 19039	8,9	14198	4,9	18	LCMSMS	gi 128376; gi 47168353; gi 157830246
21 a	Alpha-amylase/trypsin inhibitor	<i>Triticum aestivum</i>	gi 123957	7,4	18209	4,9	18	MALDIMSMS	
21 b	Alpha-amylase inhibitor	<i>Hordeum vulgare</i>	gi 2506771	5,4	15805	4,9	17	LCMSMS	
21 b	CM 17 protein precursor	<i>Triticum aestivum</i>	gi 21711	5,1	15979	4,9	17	LCMSMS	
21 b	Alpha-amylase/trypsin inhibitor	<i>Hordeum vulgare</i>	gi 585291	6,1	18513	4,9	17	LCMSMS	
21 b	CMd3 protein	<i>Hordeum vulgare</i>	gi 2264392	8,0	18458	4,9	17	LCMSMS	
21 b	LTP 1	<i>Hordeum vulgare</i>	gi 19039	8,9	14198	4,9	17	LCMSMS	gi 128376; gi 47168353; gi 157830246
22	Trypsin/amylase inhibitor	<i>Hordeum vulgare</i>	gi 225102	5,3	14737	4,4	17	LCMSMS	
		<i>subsp. vulgare</i>						MALDIMSMS	
22	Protein Z	<i>Hordeum vulgare</i>	gi 19079	5,3	19910	4,4	17	LCMSMS	gi 224339; gi 131091; gi 1310677
27	Protein Z	<i>Hordeum vulgare</i>	gi 131091	5,7	43249	5,5	18	LCMSMS	gi 1310677

27	LTP 1	<i>Hordeum vulgare</i>	gi 19039	8,9	14198	5,5	18	LCMSMS	gi 128376; gi 47168353; gi 157830246
1707	Exo-1,3-beta-glucanase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	gi 6323331	4,6	51279	4,1	56	MALDIMS MALDIMSMS	
1712 a	Protein z-type serpin	<i>Hordeum vulgare subsp. vulgare</i>	gi 1310677	5,6	43193	4,4	57	LCMSMS MALDIMS	
1712 a	Serpin	<i>Hordeum vulgare subsp. vulgare</i>	gi 1197577	5,5	42794	4,4	57	LCMSMS	
1714 a	Protein z-type serpin	<i>Hordeum vulgare subsp. vulgare</i>	gi 1310677	5,6	43193	4,5	58	LCMSMS MALDIMSMS	
1714 a	Serpin	<i>Hordeum vulgare subsp. vulgare</i>	gi 1197577	5,5	42794	4,5	58	LCMSMS	
1714 a	Exo-1,3-beta-glucanase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	gi 6323331	4,6	51279	4,5	58	LCMSMS	
2524	Protein z-type serpin	<i>Hordeum vulgare subsp. vulgare</i>	gi 1310677	5,6	43193	5,0	26	LCMSMS MALDIMSMS	
2524	Hordein B	<i>Hordeum vulgare subsp. vulgare</i>	gi 224385	7,7	30384	5,0	26	LCMSMS MALDIMSMS	
5503	LTP 1	<i>Hordeum vulgare</i>	gi 19039	8,9	14198	7,8	26	LCMSMS	gi 128376; gi 47168353; gi 157830246
5503	Hordein B	<i>Hordeum vulgare subsp. vulgare</i>	gi 224385	7,7	30384	7,8	26	LCMSMS	
5503	Protein z-type serpin	<i>Hordeum vulgare subsp. vulgare</i>	gi 1310677	5,6	43193	7,8	26	LCMSMS MALDIMSMS	

Tab. 9.2 – pokračování

Spot	název proteinu/popis	organismus	Accession No.	Teor. pI	Teor. Mr (Da)	Poz. pI	Poz. Mr (kDa)	metoda identifikace	Proteiny odpovídající stejné sérii peptidů
6430	Putative avenin-like a precursor	<i>Triticum aestivum</i>	gi 89143120	8,4	18415	8,3	19	LCMSMS MALDIMSMS	gi 89143124; gi 89143126;
6430	Hordoindoline-b1	<i>Hordeum vulgare</i> <i>subsp. vulgare</i>	gi 54661047	8,5	16112	8,3	19	LCMSMS	
7413	N/R					8,3	18		
3411	N/R					6,2	18		
2417	Trypsin/amylase inhibitor	<i>Hordeum vulgare</i> <i>subsp. vulgare</i>	gi 225102	5,3	14737	4,6	17	LCMSMS	
2314 a	D-hordein	<i>Hordeum vulgare</i> <i>subsp. vulgare</i>	gi 671537	7,6	50755	5,0	15	LCMSMS MALDIMSMS	
2314 a	Trypsin/amylase inhibitor	<i>Hordeum vulgare</i> <i>subsp. vulgare</i>	gi 225102	5,3	14737	5,0	15	LCMSMS	
2313	Alpha-amylase inhibitor	<i>Hordeum vulgare</i>	gi 123970	5,4	16418	5,2	16	LCMSMS MALDIMSMS	
2313	Heat shock protein	<i>Triticum aestivum</i>	gi 21805	6,2	16857	5,2	16	LCMSMS	gi 123545; gi 295501; gi 445136; gi 509070; gi 1536911; gi 17942916; gi 75766417; gi 112491087

3415/06	LTP 1	<i>Hordeum vulgare</i>	gi 19039	8,9	14198	6,1	16	LCMSMS	gi 128376; gi 47168353; gi 157830246
4214	Heat shock protein	<i>Triticum aestivum</i>	gi 21805	6,2	16857	6,4	15	LCMSMS	gi 123545; gi 295501; gi 445136; gi 509070; gi 1536911; gi 17942916; gi 75766417; gi 112491087
4214	D-hordein	<i>Hordeum vulgare</i> <i>subsp. vulgare</i>	gi 671537	7,6	50755	6,4	15	MALDIMSMS	gi 1167498; gi 30421167
3218	N/R					5,8	14		
4302	LTP 1	<i>Hordeum vulgare</i>	gi 19039	8,9	14198	6,7	16	LCMSMS MALDIMSMS	gi 128376; gi 47168353; gi 157830246
4305/6	LTP 1	<i>Hordeum vulgare</i>	gi 19039	8,9	14198	6,9	16	LCMSMS MALDIMSMS	gi 128376; gi 47168353; gi 157830246
4305/6	Hordoin-doline-b1	<i>Hordeum vulgare</i> <i>subsp. vulgare</i>	gi 54661047	8,5	16112	6,9	16	LCMSMS	
4411	N/R					7,3	17		
4204/17	N/R					6,7	14		
4209	N/R					6,9	14		

Tab. 9.3 – Seznam nalezených proteinů ve vzorku piva Primus

Spot	název proteinu/popis	organismus	Accession No.	Teor. pI	Teor. Mr (Da)	Poz. pI	Poz. Mr (kDa)	metoda identifikace	Proteiny odpovídající stejné sérii peptidů
17	D-hordein	<i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i>	gi 671537	7,6	50755	6,8	15	LCMSMS MALDIMSMS	gi 1167498; gi 30421167
18	D-hordein	<i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i>	gi 671537	7,6	50755	7,0	15	LCMSMS MALDIMSMS	gi 1167498; gi 30421167
18	Os08g0184600	<i>Oryza sativa</i>	gi 115475097	12,2	17088	7,0	15	LCMSMS	
19	HMW glutenin subunit	<i>Triticum aestivum</i>	gi 22090	8,6	75656	6,9	14	LCMSMS	
20	D-hordein	<i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i>	gi 671537	7,6	50755	6,7	14	LCMSMS	gi 1167498; gi 30421167
25	Alpha-amylase inhibitor	<i>Hordeum vulgare</i>	gi 123970	5,4	16418	4,8	16	LCMSMS MALDIMSMS	
25	D-hordein	<i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i>	gi 671537	7,6	50755	4,8	16	LCMSMS	gi 1167498; gi 30421167
25	LTP 1	<i>Hordeum vulgare</i>	gi 19039	8,9	14198	4,8	16	LCMSMS	gi 128376; gi 47168353; gi 157830246
26	Alpha-amylase inhibitor	<i>Hordeum vulgare</i>	gi 123970	5,4	16418	4,8	15	LCMSMS MALDIMSMS	
1815	Glucoamylase G1	<i>Aspergillus niger</i>	gi 224027	4,2	65448	4,0	162	MALDIMS MALDIMSMS	

1814	Glucoamylase G1	<i>Aspergillus niger</i>	gi 224027	4,2	65448	3,9	12	MALDIMS MALDIMSMS	
0204	Protein Z	<i>Hordeum vulgare</i>	gi 19079	5,3	19910	3,6	14	MALDIMSMS	gi 1310677
2318	Protein Z	<i>Hordeum vulgare</i>	gi 131091	5,7	43249	4,8	14	LCMSMS	
2317	Alpha-amylase inhibitor	<i>Hordeum vulgare</i>	gi 123970	5,4	16418	4,9	15	LCMSMS	
4308	N/R					7,0	16		
5208	Probable non- specific lipid- transfer protein precursor	<i>Hordeum vulgare</i>	gi 128377	6,8	10350	8,1	15	LCMSMS	
7220	Protein Z	<i>Hordeum vulgare</i>	gi 131091	5,7	43249	8,8	15	LCMSMS	

Tab. 9.4 – Seznam nalezených proteinů ve vzorku piva Pilsner Urquell

Spot	název proteinu/popis	organismus	Accession No.	Teor. pI	Teor. Mr (Da)	Poz. pI	Poz. Mr (kDa)	metoda identifikace	Proteiny odpovídající stejné sérii peptidů
13 a	LTP 1	<i>Hordeum vulgare</i>	gi 19039	8,9	14198	8,3	19	LCMSMS	gi 128376; gi 47168353; gi 157830246
13 a	Putative avenin-like a precursor	<i>Triticum aestivum</i>	gi 89143120	8,4	18415	8,3	19	LCMSMS	gi 89143124; gi 89143126;
13 b	LTP 1	<i>Hordeum vulgare</i>	gi 19039	8,9	14198	8,3	18	LCMSMS	gi 128376; gi 47168353; gi 157830246
13 b	Putative avenin-like a precursor	<i>Triticum aestivum</i>	gi 89143120	8,4	18415	8,3	18	LCMSMS	gi 89143124; gi 89143126;
14	LTP 1	<i>Hordeum vulgare</i>	gi 19039	8,9	14198	6,9	16	LCMSMS MALDIMSMS	gi 128376; gi 47168353; gi 157830246
15	LTP 1	<i>Hordeum vulgare</i>	gi 19039	8,9	14198	6,7	16	LCMSMS MALDIMSMS	gi 128376; gi 47168353; gi 157830246
16	LTP 1	<i>Hordeum vulgare</i>	gi 19039	8,9	14198	7,0	16	LCMSMS	gi 128376; gi 47168353; gi 157830246
23	HMW glutenin subunit	<i>Triticum aestivum</i>	gi 22090	8,6	75656	4,8	14	LCMSMS	
24	D-hordein	<i>Hordeum vulgare</i> <i>subsp. vulgare</i>	gi 671537	7,6	50755	4,9	15	LCMSMS	gi 1167498; gi 30421167

24	Globulin-like protein	<i>Oryza sativa</i>	gi 34495244	6,8	52034	4,9	15	LCMSMS	gi 115455865; gi 125546015; gi 125588221; gi 228310
24	Alpha-amylase/trypsin inhibitor	<i>Triticum aestivum</i>	gi 123957	7,4	18209	4,9	15	LCMSMS	
28	Probable non-specific lipid-transfer protein precursor	<i>Hordeum vulgare</i>	gi 128377	6,8	10350	8,1	15	LCMSMS	
29	LTP 1	<i>Hordeum vulgare</i>	gi 19039	8,9	14198	8,9	16	LCMSMS MALDIMSMS	gi 128376; gi 47168353; gi 157830246
30	LTP 1	<i>Hordeum vulgare</i>	gi 19039	8,9	14198	9,1	16	LCMSMS MALDIMSMS	gi 128376; gi 47168353; gi 157830246
30	Non-specific lipid-transfer protein 1 precursor	<i>Hordeum vulgare</i>	gi 128376	8,7	12293	9,1	16	MALDIMS	
31	LTP 1	<i>Hordeum vulgare</i>	gi 19039	8,9	14198	9,2	16	LCMSMS MALDIMS MALDIMSMS	gi 128376; gi 47168353; gi 157830246
1712 c	Exo-1,3-beta-glucanase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	gi 6323331	4,6	51279	4,4	57	LCMSMS	
1712 c	Protein z-type serpin	<i>Hordeum vulgare subsp. vulgare</i>	gi 1310677	5,6	43193	4,4	57	LCMSMS MALDIMSMS	

Tab. 9.4 – pokračování

Spot	název proteinu/popis	organismus	Accession No.	Teor. pI	Teor. Mr (Da)	Poz. pI	Poz. Mr (kDa)	metoda identifikace	Proteiny odpovídající stejné sérii peptidů
1712 c	Glucan 1,3-beta-glucosidase precursor	<i>Saccharomyces bayanus</i>	gi 46395590	4,4	51196	4,4	57	LCMSMS	
1712 c	Serpin	<i>Hordeum vulgare subsp. vulgare</i>	gi 1197577	5,5	42794	4,4	57	LCMSMS	
1712 c	Chain A	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	gi 37926403	4,5	46935	4,4	57	MALDIMS	
1714 c	Exo-1,3-beta-glucanase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	gi 6323331	4,6	51279	4,5	58	LCMSMS	
1714 c	Protein z-type serpin	<i>Hordeum vulgare subsp. vulgare</i>	gi 1310677	5,6	43193	4,5	58	LCMSMS	
1714 c	Serpin	<i>Hordeum vulgare subsp. vulgare</i>	gi 1197577	5,5	42794	4,5	58	LCMSMS	
1714 c	Ovalbumin	<i>Gallus gallus</i>	gi 45384056	5,2	42884	4,5	58	MALDIMS	
1714 c	Ovalbumin	<i>Gallus gallus</i>	gi 28566340	5,2	42877	4,5	58	MALDIMSMS	
1715	Cell wall protein with similarity to glucanases	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	gi 6321718	4,7	40148	4,1	70	LCMSMS	
1715	Cell wall protein with similarity to glucanases	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	gi 6323964	4,5	40445	4,1	70	LCMSMS	

1715	Putative protein of unknown function	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	gi 6322022	4,4	99676	4,1	70	LCMSMS	gi 40645464; gi 40645466; gi 74697748; gi 151943000
1715	Protein z-type serpin	<i>Hordeum vulgare subsp. vulgare</i>	gi 1310677	5,6	43193	4,1	70	LCMSMS	
1728	Cell wall protein with similarity to glucanases	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	gi 6323964	4,5	40445	4,1	60	LCMSMS MALDIMSMS	
1728	Cell wall protein with similarity to glucanases	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	gi 6321718	4,7	40148	4,1	60	LCMSMS	gi 151943551
1728	Putative protein of unknown function	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	gi 6322022	4,4	99676	4,1	60	LCMSMS	gi 40645464; gi 40645466; gi 74697748; gi 151943000
1728	Soluble cell wall protein	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	gi 151943551	4,7	40149	4,1	60	MALDIMSMS	
1729	Cell wall protein with similarity to glucanases	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	gi 6321718	4,7	40148	4,1	56	LCMSMS MALDIMSMS	gi 151943551;
1729	protein z-type serpin	<i>Hordeum vulgare subsp. vulgare</i>	gi 1310677	5,6	43193	4,1	56	LCMSMS	
1729	Exo-1,3-beta-glucanase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	gi 6323331	4,6	51279	4,1	56	LCMSMS	gi 37926403

Tab. 9.4 – pokračování

Spot	název proteinu/popis	organismus	Accession No.	Teor. pI	Teor. Mr (Da)	Poz. pI	Poz. Mr (kDa)	metoda identifikace	Proteiny odpovídající stejné sérii peptidů
1729	Glycolytic enzyme phosphoglucose isomerase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	gi 6319673	6,0	61261	4,1	56	LCMSMS	
1737	Exo-1,3-beta-glucanase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	gi 6323331	4,6	51279	4,3	59	LCMSMS MALDIMS MALDIMSMS	
1737	Glucan 1,3-beta-glucosidase precursor	<i>Saccharomyces bayanus</i>	gi 46395590	4,4	51196	4,3	59	LCMSMS	
1737	Protein z-type serpin	<i>Hordeum vulgare subsp. vulgare</i>	gi 1310677	5,6	43193	4,3	59	LCMSMS	
1737	Serpin	<i>Hordeum vulgare subsp. vulgare</i>	gi 1197577	5,5	42794	4,3	59	LCMSMS	
2415	LTP 1	<i>Hordeum vulgare</i>	gi 19039	8,9	14198	4,9	17	LCMSMS	
2415	CM 17 protein precursor	<i>Triticum aestivum</i>	gi 21711	5,1	15979	4,9	17	LCMSMS	
2416	trypsin/amylase inhibitor	<i>Hordeum vulgare subsp. vulgare</i>	gi 225102	5,3	14737	5,0	17	LCMSMS MALDIMS	
2416	CM 17 protein precursor	<i>Triticum aestivum</i>	gi 21711	5,1	15979	5,0	17	LCMSMS	
2314 c	D-hordein	<i>Hordeum vulgare</i>	gi 671537	7,6	50755	4,8	15	LCMSMS	gi 1167498; gi 30421167

2315	Heat shock protein 16.9B	<i>Triticum aestivum</i>	gi 21805	6,2	16857	5,0	15	LCMSMS	
2315	D-hordein	<i>Hordeum vulgare</i>	gi 671537	7,6	50755	5,0	15	MALDIMSMS	
2329	N/R					5,0	16		
5309	Chain A, Non-Specific Lipid Transfer Protein	<i>Hordeum vulgare</i>	gi 47168353	8,2	9689	7,9	16	LCMSMS	
5309	LTP 1	<i>Hordeum vulgare</i>	gi 19039	8,9	14198	7,9	16	MALDIMSMS	
5311/6321	LTP 1	<i>Hordeum vulgare</i>	gi 19039	8,9	14198	8,1	16	LCMSMS	
6323	Chain A, Non-Specific Lipid Transfer Protein		gi 47168353	8,2	9689	8,3	16	LCMSMS	gi 157830246
		<i>Hordeum vulgare</i>							
6323	LTP 1	<i>Hordeum vulgare</i>	gi 19039	8,9	14198	8,3	16	MALDIMSMS	

Tab. 9.5 – Seznam nalezených proteinů ve vzorku piva Heineken

Spot	název proteinu/popis	organismus	Accession No.	Teor. pI	Teor. Mr (Da)	Poz. pI	Poz. Mr (kDa)	metoda identifikace	Proteiny odpovídající stejné sérii peptidů
1	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	gi 6322409	8,3	35728	8,8	35	LCMSMS MALDIMS MALDIMSMS	gi 151945032; gi 3726
1	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>Synechococcus sp.</i>	gi 86604752	6,5	36691	8,8	35	MALDIMSMS	
2	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	gi 151943468	6,3	35711	7,4	36	LCMSMS	
2	Glyceraldehyde phosphate dehydrogenase	<i>Saccharomycetale s</i>	gi 229428	9,2	35524	7,4	36	LCMSMS	
2	Unnamed protein product	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	gi 3726	8,8	35662	7,4	36	LCMSMS	gi 6322409; gi 151945032;
2	Protein z-type serpin	<i>Hordeum vulgare subsp. vulgare</i>	gi 1310677	5,6	43193	7,4	36	LCMSMS	
2	Coproporphyrin oge oxidase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	gi 171316		37674	7,4	36	LCMSMS	gi 6320249; gi 51247671; gi 56966162
2	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	gi 6321631	6,5	35724	7,4	36	MALDIMS MALDIMSMS	

3	Glyceraldehyde -3-phosphate dehydrogenase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	gi 151943468	6,3	35711	7,9	36	LCMSMS	
3	Glyceraldehyde -3-phosphate dehydrogenase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	gi 6322409	8,3	35728	7,9	36	LCMSMS	gi 151945032; gi 3726
3	Hypothetical protein Kpol_1060p40	<i>Vanderwaltozyma polyspora</i>	gi 156844358	6,2	35885	7,9	36	LCMSMS	
3	Glyceraldehyde -3-phosphate dehydrogenase	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	gi 1245703	6,4	35386	7,9	36	LCMSMS	
3	Protein z-type serpin	<i>Hordeum vulgare subsp. vulgare</i>	gi 1310677	5,6	43193	7,9	36	LCMSMS	
3	Glyceraldehyde -3-phosphate dehydrogenase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	gi 6322468	6,5	35824	7,9	36	MALDIMSMS	
4	Glyceraldehyde -3-phosphate dehydrogenase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	gi 6322409	8,3	35728	8,9	35	LCMSMS MALDIMS MALDIMSMS	
5	Chain A Phosphoglycera te Mutase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	gi 2624630	8,9	27461	9,0	27	LCMSMS	gi 5542362; gi 6322697; gi 157884466
5	Mutase,phosph oglycerate	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	gi 223471	9,1	26900	9,0	27	MALDIMS MALDIMSMS	
6	Chain A Phosphoglycera te Mutase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	gi 2624630	8,9	27461	9,1	24	LCMSMS	gi 5542362; gi 6322697; gi 157884466
6	Mutase,phosph oglycerate	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	gi 223471	9,1	26900	9,1	24	MALDIMS MALDIMSMS	

Tab. 9.5 – pokračování

Spot	název proteinu/popis	organismus	Accession No.	Teor. pI	Teor. Mr (Da)	Poz. pI	Poz. Mr (kDa)	metoda identifikace	Proteiny odpovídající stejné sérii peptidů
7	3-phosphoglycerate kinase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	gi 10383781	7,1	44711	5,7	25	LCMSMS	gi 157833610; gi 157836867; gi 157876436
7	Protein z-type serpin	<i>Hordeum vulgare subsp. vulgare</i>	gi 1310677	5,6	43193	5,7	25	LCMSMS	
7	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	gi 6322409	8,3	35728	5,7	25	LCMSMS	gi 6322468; gi 151945032; gi 3726
7	LTP 1	<i>Hordeum vulgare</i>	gi 19039	8,9	14198	5,7	25	LCMSMS	
8	Chain A Triosephosphate Isomerase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	gi 230405	5,8	26648	5,5	21	LCMSMS	gi 349951; gi 6320255; gi 14719493; gi 28374000; gi 28374002
8	Unnamed protein product	<i>Kluyveromyces lactis</i>	gi 50312993	5,8	27978	5,5	21	LCMSMS	gi 52783440
8	LTP 1	<i>Hordeum vulgare</i>	gi 19039	8,9	14198	5,5	21	LCMSMS	gi 128376; gi 47168353; gi 157830246
9	Chain A Triosephosphate Isomerase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	gi 230405	5,8	26648	6,0	21	LCMSMS	gi 349951; gi 6320255; gi 14719493; gi 28374000; gi 28374002
9	Unnamed protein product	<i>Kluyveromyces lactis</i>	gi 50312993	5,8	27978	6,0	21	LCMSMS	gi 52783440

9	Triose phosphate isomerase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	gi 6320255	5,7	26779	6,0	21	MALDIMSMS	
3708	Phosphoglucose isomerase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	gi 6319673	6,0	61261	6,3	60	LCMSMS	
3708	Protein z-type serpin	<i>Hordeum vulgare subsp. vulgare</i>	gi 1310677	5,6	43193	6,3	60	MALDIMSMS	
4706	N/R					6,4	49		
3709	Enolase 1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	gi 119336	6,1	46885	6,4	49	LCMSMS	gi 1065025; gi 6321693; gi 39654415; gi 39654417; gi 157830958
3709	Enolase II	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	gi 6321968	5,7	46885	6,4	49	LCMSMS MALDIMS MALDIMSMS	
3709	Protein z-type serpin	<i>Hordeum vulgare subsp. vulgare</i>	gi 1310677	5,6	43193	6,7	61	LCMSMS MALDIMS MALDIMSMS	
4706	Phosphoglucose isomerase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	gi 6319673	6,0	61261	6,7	47	LCMSMS	
4707	Enolase II	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	gi 6321968	5,7	46885	5,5	21	LCMSMS	
4707	Enolase 1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	gi 119336	6,1	46885	6,7	47	LCMSMS	gi 1065025; gi 6321693; gi 39654415; gi 39654417; gi 157830958

Tab. 9.5 – pokračování

Spot	název proteinu/popis	organismus	Accession No.	Teor. pI	Teor. Mr (Da)	Poz. pI	Poz. Mr (kDa)	metoda identifikace	Proteiny odpovídající stejné sérii peptidů
4707	Hypothetical protein CAGL0I02486 g	<i>Candida glabrata</i>	gi 50289857	5,8	46710	6,7	47	LCMSMS	
4707	Protein z-type serpin	<i>Hordeum vulgare subsp. vulgare</i>	gi 1310677	5,6	43193	6,7	47	MALDIMS MALDIMSMS	
412	Hypothetical protein Kpol_1050p87	<i>Vanderwaltozyma polyspora</i>	gi 156848406	5,6	46819	7,2	49	LCMSMS	
4712	Hypothetical protein CAGL0I02486 g	<i>Candida glabrata</i>	gi 50289857	5,8	46710	7,2	49	LCMSMS	
4712	Enolase II	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	gi 6321968	5,7	46885	7,2	49	LCMSMS	
4712	Enolase 1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	gi 119336	6,2	46773	7,2	49	LCMSMS MALDIMS MALDIMSMS	
5702	Hypothetical protein Kpol_260p5	<i>Vanderwaltozyma polyspora</i>	gi 156836509	5,1	30744	7,4	49	LCMSMS	

5702	Enolase II	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	gi 6321968	5,7	46885	7,4	49	LCMSMS	
5702	Enolase I	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	gi 119336	6,2	46773	7,4	49	LCMSMS	gi 1065025; gi 6321693; gi 39654415; gi 39654417; gi 157830958